

Die Serin/Threonin Kinase Prp4 aus
Schizosaccharomyces pombe verbessert die Erkennung
von Introns mit schwachen Spleißstellen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Daniela Eckert
aus Hannover

1. Referent: Prof. Dr. Norbert F. Käufer
2. Referent: Prof. Dr. André Fleißner
eingereicht am: 28.09.2015
mündliche Prüfung (Disputation) am: 12.11.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Eckert, D., Guerra-Moreno, A., Zock-Emmenthal, S., Klinger, F., Ayté, J., Käufer, N.F.: Prp1 and Prp4 kinase control splicing of essential cell cycle genes. (Poster) 7th International Fission Yeast Meeting, London (2013)

Andrée, N., Eckert, D., Zock-Emmenthal, S., Ayté, J., Käufer, N.F.: Prp4 kinase – an agent of quality control during spliceosome activation. (Poster) Annual Conference of the German Genetics Society (GfG)-Genetics 2015, Kiel

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary	2
I Einleitung	3
1 Hefen als Modellorganismen	3
1.1 Die Spalthefe <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4
2 Prä-mRNA Spleißen.....	5
2.1 Die Spleißreaktion	6
2.2 Intronerkennung und ihre Tücken.....	9
2.3 SR-Proteine: Helfer bei der Intronerkennung	11
2.4 Pseudouridine (Ψ) in spleißosomalen snRNAs	12
3 Prp4, eine Serin/Threonin Kinase	14
3.1 Der Aufbau der Prp4 Kinase.....	15
3.2 Die Substrate der Prp4 Kinase	16
4 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit	19
II Ergebnisse	20
1 Konstruktion einer analog-sensitiven Prp4 Kinase	20
2 Der Inhibitor 1NM-PP1 hemmt die Prp4 _{as2} Kinase	22
2.1 Die Inhibitoren	23
2.2 Die Zugabe des Inhibitors 1NM-PP1 führt zu einem Wachstumsstopp	23
2.3 Die Konzentration des Inhibitors beeinflusst Dauer und Ausprägung der Inhibition	25
3 Die Inhibition der Prp4 Kinase beeinträchtigt den Zellzyklus und die Spleißeffizienz	28
3.1 Nach Inhibition der Kinase arretieren die Zellen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus	28
3.2 Die Inhibition der Prp4 Kinase führt nicht bei allen intronhaltigen Genen zu einer Akkumulation von prä-mRNA	32

4	Bei 36 °C zeigen Zellen, die das ts-Allel <i>prp1-127^{ts}</i> exprimieren, ausschließlich bei Prp4-abhängigen Introns eine Akkumulation von prä-mRNA	35
5	Die RNA-Sequenzierung bestätigt die Existenz von zwei verschiedenen Intronklassen	36
5.1	Die Introns der Spalthefe wurden zwei Klassen zugeordnet	37
5.2	Die Abhängigkeit von der Aktivität der Prp4 Kinase ist intronspezifisch.....	38
6	Die Information, ob ein Intron Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt wird, liegt im Intron und den angrenzenden Nukleotiden	41
7	Prp4-abhängige und -unabhängige Introns können durch Mutationen in der Exon1/5'-SS ineinander umgewandelt werden.....	42
7.1	Konstruktion des Reportergens <i>res1'</i>	43
7.2	<i>res1'</i> -ein Reportergen mit einem Prp4-abhängigen Intron	44
7.3	Konstruktion des Reportergens <i>ppk8'</i>	52
7.4	<i>ppk8'</i> , ein Reportergen, das ein Prp4-unabhängiges Intron besitzt	53
7.5	Eine starke Exon1/5'-SS kompensiert Mutationen in der BS von <i>res1'</i>	57
III	Diskussion	61
1	Die Evolution spleißosomaler Introns	61
2	Die Aktivität der Prp4 Kinase wird benötigt, um die Basenpaarung der U1 snRNA mit der Exon1/5'-SS zu stabilisieren	62
3	Die Prp4 Kinase kontrolliert die Bindung des U1 und U2 snRNPs an der prä-mRNA	66
4	Prp1 und Srp2 könnten die Interaktion von Spleißosom und prä-mRNA stabilisieren	69
5	Ausblick	71
IV	Material und Methoden	72
1	Material	72
1.1	Chemikalien	72
1.2	Geräte, Zentrifugen und Rotoren	74
2	Stämme und Kulturbedingungen.....	75
2.1	Stämme und Medien der Spalthefe <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	75
2.2	Stämme und Medien der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79

2.3	Stämme und Medien für <i>Escherichia coli</i>	79
3	Vektoren und Konstrukte	81
3.1	Konstruktion der analog-sensitiven Prp4 Kinase	81
3.2	Integration des <i>res1</i> - und <i>ade2-II</i> -Introns in das intronlose <i>ura4</i> -Gen	83
3.3	Konstruktion der Reportergene <i>res1'</i> und <i>ppk8'</i>	85
4	Molekularbiologische Methoden.....	90
4.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	90
4.2	Transformation von <i>E. coli</i>	90
4.3	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	90
4.4	Plasmid Mini-Präparation nach Gatermann et al	90
4.5	Reinigung und Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA.....	91
4.6	Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	91
4.7	Restriktionsverdau	91
4.8	Ligation	92
4.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	92
4.10	Extraktion aus Agarose-Gelen	92
4.11	Sequenzierung	92
4.12	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	92
4.13	<i>Pfu</i> -Mutagenese.....	93
4.14	<i>In vitro</i> Mutagenese nach Kunkel (1985).....	94
4.15	Yeast Recombinational Cloning (YRC).....	95
4.16	Plasmid-Präparation aus <i>S. cerevisiae</i>	96
5	Methoden zur Untersuchung von <i>S. pombe</i>	97
5.1	Kreuzung von <i>S. pombe</i> Stämmen	97
5.2	Transformation in <i>S. pombe</i>	97
5.3	Kolonie-PCR.....	98
5.4	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pombe</i>	98
5.5	ATP-analoge Inhibitoren	99

5.6	FACS-Analyse	99
5.7	Fluoreszenzmikroskopie	100
5.8	RNA-Isolierung aus <i>S. pombe</i> nach Nischt et al (1986)	100
5.9	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	101
5.10	RNA-Sequenzierung von Prp4 _{as2}	104
V	Referenzen.....	105
VI	Anhang	120
1	DNA- und Aminosäuresequenz der spPrp4 Kinase (GenBank acc. No. L10739.1)...	120
2	Trotz stündlicher Inhibitorzugabe beginnen die Zellen erneut zu wachsen.....	121
3	Häufigkeitsverteilung der Basen an den einzelnen Positionen der Spleißstellen bei Prp4-unabhängigen und –abhängigen Introns.....	121
	Abkürzungsverzeichnis.....	123
	Danksagung.....	125

Zusammenfassung

Die Genexpression in eukaryotischen Zellen gliedert sich in Transkription und verschiedene Prozessierungsschritte. Einer dieser Prozessierungsschritte ist das prä-mRNA Spleißen. Dabei werden aus der prä-mRNA, die sich in eukaryotischen Zellen aus Exons und Introns zusammensetzt, die Introns herausgespleißt. Die beiden Exons werden miteinander verknüpft, so dass die reife mRNA entsteht, die anschließend zur Proteinbiosynthese verwendet werden kann. Das Herausspleißen der Introns wird vom Spleißosom durchgeführt, welches anhand der Exon1/5'-Spleißstelle, der Verzweigungssequenz und der 3'-Spleißstelle den Anfang und das Ende des Introns erkennt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der Serin/Threonin Kinase Prp4 untersucht, die am Spleißprozess beteiligt ist. Dazu wurde eine analog-sensitive Kinase konstruiert, die sich durch Zugabe des ATP-analogen Inhibitors 1NM-PP1 hemmen lässt. Sowohl die Analyse einzelner Introns durch RT-PCR als auch eine Sequenzierung der Gesamt-RNA zeigen nach Inhibition der Prp4 Kinase, dass zwei Klassen von Introns existieren. Die eine Klasse der Introns wird nach Inhibition der Kinase weiter effizient gespleißt, während die andere Klasse nach Inhibition prä-mRNA akkumuliert. Die Introns, die die Aktivität der Prp4 Kinase benötigen um gespleißt zu werden, werden als Prp4-abhängige Introns bezeichnet. Und die Introns, die nach Inhibition weiter effizient gespleißt werden, werden Prp4-unabhängig genannt. Die Prp4-Abhängigkeit ist intronspezifisch und nicht genspezifisch. Das bedeutet, dass in einem Gen alle Introns Prp4-abhängig oder –unabhängig gespleißt werden können, aber auch Gene existieren, die beide Intronklassen enthalten. Der Vergleich beider Intronklassen zeigt ausschließlich in den Sequenzen der Spleißstellen geringfügige Unterschiede. Um zu untersuchen, ob die Sequenz der Spleißstellen bezüglich der Prp4-Abhängigkeit eine Rolle spielt, wurden zwei Reportergene konstruiert. Dazu wurden die Gene *res1*, dessen Intron Prp4-abhängig gespleißt wird, und *ppk8*, welches unabhängig von der Kinase gespleißt wird, ausgewählt und in den *leu1*-Lokus von *Schizosaccharomyces pombe* integriert. Die Mutationsanalyse von Exon1/5'-SS und Verzweigungssequenz zeigt, dass durch Erhöhung der Komplementarität zur U1 und U2 snRNA des Spleißosoms ein Prp4-abhängiges Intron in ein Prp4-unabhängiges Intron umgewandelt werden kann. Wird die Komplementarität der snRNAs zur prä-mRNA verringert, kann aus einem Prp4-unabhängig gespleißten Intron ein Prp4-abhängiges werden. Das zeigt, dass die Aktivität der Prp4 Kinase notwendig ist, um Introns zu spleißen, deren Spleißstellen von der Konsensussequenz abweichen und damit als schwach bezeichnet werden.

Summary

The gene expression of eukaryotic cells is divided into transcription and several processing steps. One of these processing steps is pre-mRNA splicing. In eukaryotic cells pre-mRNA consists of exons and introns and the introns have to be removed during the splicing reaction. The exons are joined together and the mature mRNA is formed. This mRNA will be used for protein biosynthesis. The splicing of introns is performed by the spliceosome which recognizes the beginning and the end of an intron via their exon1/5'-splice site, branch sequence and 3'-splice site.

In this study the function of the serine/threonine kinase Prp4 which is involved in the splicing process is investigated. Therefore, an analog-sensitive kinase was constructed which can be inhibited using the ATP-analogue inhibitor 1NM-PP1. After inhibition of the kinase several intron-containing genes were analyzed by RT-PCR. Moreover, the total RNA was sequenced. Both approaches revealed two classes of introns. One of these intron classes is still spliced after inhibition of the kinase while the other class accumulates pre-mRNA. The introns which need the activity of the kinase to be spliced out are called Prp4-dependent introns. And those that are spliced efficiently after inhibition of the kinase are named Prp4-independent introns. The Prp4-dependency is intron-specific and not gene-specific. That means that in one gene all introns can be Prp4-independent or -dependent. However both intron classes can also be found within one gene. If both intron classes are compared only small differences between the sequences of the splice sites can be observed. Two reporter genes were constructed to analyse if the sequence of the splice sites play a role in Prp4-dependency. Therefore, the gene *res1* which contains a Prp4-dependent intron and the gene *ppk8* which contains a Prp4-independent intron were integrated into the *leu1*-locus of *Schizosaccharomyces pombe*. The analysis of different mutations in exon1/5'-SS and branch sequence showed that increasing the complementarity to the snRNAs U1 and U2 of the spliceosome can change a Prp4-dependent intron in an independent one. Decreasing the complementarity of a Prp4-independent intron leads to Prp4-dependency. That shows that the activity of the Prp4 kinase is necessary for splicing of introns whose splice sites differ from the consensus sequence. Those are called weak splice sites.

I Einleitung

1 Hefen als Modellorganismen

Unter dem Begriff Hefe ist eine große Vielfalt sehr verschiedener einzelliger Pilze vereint. Hefen gehören zur Abteilung der Ascomyceten (Schlauchpilze), welche nach ihren Fortpflanzungsstrukturen, den schlauchförmigen Asci, benannt wurden. In der Molekularbiologie sind es insbesondere zwei Arten, die bisher meistens für die Forschung als Modellorganismen verwendet werden: die Knosp- oder Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*. Beides sind einzellige Eukaryoten, deren Genom vollständig sequenziert ist (Goffeau et al, 1996; Wood et al, 2002; Wood et al, 2001). Sie sind im Labor leicht zu kultivieren, können im haploiden Zustand vermehrt und dadurch mit Hilfe etablierter molekularbiologischer Methoden genetisch leicht verändert werden. Und obwohl es sich bei beiden um Einzeller handelt sind es Eukaryoten, die bei grundlegenden zellbiologischen Prozessen viele Gemeinsamkeiten mit mehrzelligen Eukaryoten aufweisen (Forsburg, 2005).

Obwohl *S. pombe* und *S. cerevisiae* beide den Hefen zugeordnet werden wird davon ausgegangen, dass sie sich schon vor mehr als 1000 Millionen Jahren evolutionär auseinander entwickelt haben (Hedges, 2002). Das hat dazu geführt, dass sie neben vieler Gemeinsamkeiten, große Unterschiede bei einigen zellulären Prozessen aufweisen, wie zum Beispiel dem prä-mRNA Spleißen (Aravind et al, 2000; Forsburg, 2005). Viele Erkenntnisse im Spleißen sind bisher mit *S. cerevisiae* gewonnen worden. Wird aber die Zusammensetzung des Spleißosoms in *S. pombe* und *S. cerevisiae* miteinander verglichen, zeigt sich, dass eine ganze Reihe von Proteinen, die im Spleißprozess von Bedeutung sind und auch in Mammalia vorkommen, in *S. cerevisiae* nicht vorhanden sind (Aravind et al, 2000). Dazu gehört neben den Serin/Arginin-reichen (SR) Proteinen Srp1 (hsSRSF2) und Srp2 (hsSRSF4/5/6), den SR-ähnlichen Proteinen Uaf2 (hsU2AF1) und Rsd1 (hsRBM23/39) auch die in dieser Arbeit untersuchte Serin/Threonin Kinase Prp4 (hsPRPF4B) (Aravind et al, 2000; Käufer & Potashkin, 2000; Plass et al, 2008; Wood et al, 2002; Wood et al, 2001). Beide Hefen besitzen im Vergleich zu Mammalia eher kleine Introns, die in *S. pombe* eine durchschnittliche Größe von 83 nt aufweisen und die in *S. cerevisiae* bei 232 nt liegt. (Neuvéglise et al, 2011; Wood et al, 2002; Wood et al, 2012). In *S. cerevisiae* ist die Anzahl der Introns gering. Es enthalten insgesamt nur etwa 4,3 % der Gene überhaupt ein Intron und nur 0,2 % der Gene mehr als eins. In *S. pombe* dagegen liegen 44,6 % intronhaltige Gene vor, wobei 20 % davon nur ein einzelnes Intron besitzen und 24,6 % multi-intron Gene sind (Schwartz et al, 2008).

1.1 Die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*

Die Spaltheife *S. pombe* ist ein einzelliger eukaryotischer Organismus, der 1893 erstmals von Paul Lindner aus einem ostafrikanischen Hirsebier isoliert wurde. Lindner hat den Namen *Schizosaccharomyces* eingeführt, um auszudrücken, dass dieser Organismus zwar Eigenschaften wie Sporenbildung und Fermentation mit der Gattung *Saccharomyces* gemein hat, sich im Gegensatz dazu aber durch Spaltung (*Schizo-*) teilt (Lindner, 1893). Der Name *pombe* entspricht dem Swahili Wort für Bier, für dessen Herstellung die Hefe verwendet wurde. Im Jahr 1950 führte Urs Leupold die ersten genetischen Untersuchungen mit *S. pombe* durch (Leupold, 1950).

Die Spaltheife ist eine zylindrische, stäbchenförmige Zelle, die an ihren Enden wächst, bis sie sich mittig teilt und zwei gleich große Tochterzellen entstehen (Abbildung 1). Nach der Teilung beginnt zuerst das „alte“ Ende mit dem erneuten Wachstum, während später im Zellzyklus auch das „neue“ Ende sich verlängert und eine bipolare Zelle entsteht (Hayles & Nurse, 2001; Mitchison & Nurse, 1985). Sie hat im Durchschnitt eine Dicke von 3-4 µm und eine Länge von 13-14 µm bei der Teilung (Fantes, 1977).

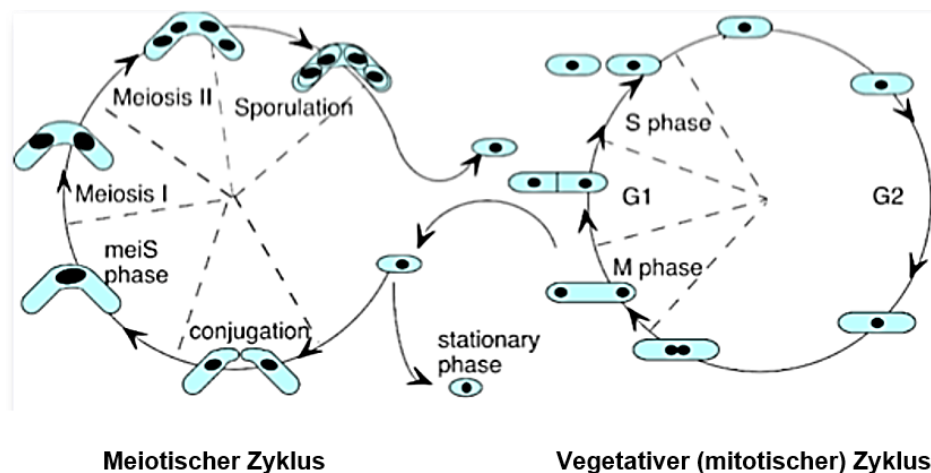


Abbildung 1| Schematische Darstellung des Lebenszyklus der Spaltheife *S. pombe*

Während des mitotischen Zyklus (rechts) teilt sich die Zelle und zwei haploide Tochterzellen entstehen. Im meiotischen Zyklus verschmelzen zwei Zellen unterschiedlichen Paarungstyps und bilden eine Zygote, aus der letztlich vier haploide Sporen hervorgehen. Die Zellkerne sind als schwarze Kreise dargestellt. Die Abbildung wurde der Webseite des Labors von Susan L. Forsburg unter <http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/main4.html> entnommen (am 15.7.2015).

Der Lebenszyklus der Spaltheife wechselt zwischen vegetativer Fortpflanzung und sexueller Reproduktion (Abbildung 1). Je nach Umgebungsbedingung hat die Zelle die Möglichkeit (1) im mitotischen Zyklus zu verbleiben, (2) in eine stationäre Ruhephase zu gehen oder (3) in den meiotischen Zyklus einzutreten (Harigaya & Yamamoto, 2007).

Bei gutem Nährstoffangebot findet der mitotische Zyklus mit Wachstum und Teilung statt. Dieser lässt sich in die vier Phasen G1-, S-, G2- und M-Phase aufteilen. Verbleibt die Zelle im mitotischen Zyklus, beginnt sie in der G1-Phase sich auf die folgende DNA-Replikation vorzubereiten. In der S-Phase wird die DNA repliziert und damit ihr Gehalt verdoppelt. Die darauf folgende G2-Phase, die bei *S. pombe* die längste Phase des Zellzyklus ist, wird für Wachstum und damit zur Vergrößerung der Zelle genutzt. Außerdem werden die Proteine bereitgestellt, die für die anschließende M-Phase benötigt werden. In der M-Phase findet die Mitose statt. Dabei werden die Schwesterchromatiden getrennt, zu den Polen transportiert und abschließend auf zwei Zellkerne verteilt. Die Zytokinese, bei der sich das Zytoplasma trennt, ein Septum gebildet wird und letztlich zwei Tochterzellen entstehen, beginnt in *S. pombe* in der M-Phase, wird allerdings unter Laborbedingungen erst in der S-Phase vollendet. Ein mitotischer Zyklus dauert in *S. pombe* bei einer Temperatur von 30 °C je nach Medium zwischen 2,5-3 Stunden, wobei M-, G1- und S-Phase nur je 10 % der Gesamtdauer des Zellzyklus einnehmen (Mitchison, 1971).

Bei ungünstigen Umweltbedingungen wie z. B. Stickstoffmangel arretieren die Zellen in der G1-Phase. Diese haploiden Zellen können fusionieren, wenn sie einen unterschiedlichen Paarungstyp aufweisen, was zu einer diploiden Zygote führt. Diese durchläuft eine Runde der DNA-Replikation, an die sich sowohl die erste, als auch die zweite meiotische Teilung anschließt, die dann sofort in das Sporulationsprogramm übergeht. Dabei entstehen vier haploide Sporen, die sich in einem Ascus befinden. Die Sporen können je nach Nährstoffangebot wieder auskeimen und in den mitotischen Zyklus übergehen oder als Überdauerungsform bestehen (Gutz H et al, 1974; Harigaya & Yamamoto, 2007).

2 Prä-mRNA Spleißen

Eukaryotische prä-mRNA wird im Zellkern durch verschiedene Prozessierungsschritte modifiziert, bevor sie in das Zytoplasma exportiert und bei der Proteinbiosynthese verwendet wird. Prä-mRNA Spleißen ist dabei, neben 5'-Capping und 3'-Polyadenylierung, ein essentieller Schritt, der durch das Spleißosom, ein Ribonukleoprotein-Komplex, katalysiert wird (Brody & Abelson, 1985). Es werden dabei nicht-kodierende Sequenzen (Introns) in der prä-mRNA erkannt, herausgeschnitten und die kodierenden Sequenzen (Exons) miteinander verknüpft, so dass die reife mRNA entsteht (Berget et al, 1977; Chow et al, 1977).

2.1 Die Spleißreaktion

Damit ein Intron fehlerfrei entfernt werden kann, ist es notwendig, dass das Spleißosom exakt den Anfang und das Ende eines jeden Introns erkennt. Daran sind vier kurze Sequenzabschnitte beteiligt (Abbildung 2). Dazu gehören die Exon-Intron-Übergänge am 5′- und 3′-Ende des Introns, die als 5′- und 3′-Spleißstelle (SS) bezeichnet werden. Außerdem die Verzweigungssequenz (BS, *engl. branch sequence*), in der sich das Adenosin befindet, welches den Verzweigungspunkt (BP, *engl. branch point*) bildet (Burge et al, 1999). Des Weiteren kann sich zwischen BP und 3′-SS zusätzlich eine pyrimidinreiche Region befinden, die als Pyrimidin-Trakt bezeichnet wird. Diese ist in den meisten Pilzen nur schwach oder gar nicht vorhanden, in den Introns der Metazoen aber sehr ausgeprägt (Schwartz et al, 2008).

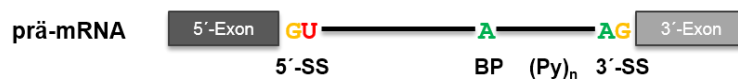


Abbildung 2| Charakteristische Merkmale eines Introns

Gezeigt sind zwei Exons (Rechtecke), die durch ein Intron (Linie) getrennt sind. Die konservierten Nukleotide, wie das GU am Anfang des Introns, das Adenosin am BP und das AG am Ende des Introns sind farblich hervorgehoben. 5′-SS, 5′-Spleißstelle; BP, Verzweigungspunkt; (Py)_n, Pyrimidin-Trakt; 3′-SS, 3′-Spleißstelle.

Das Spleißosom selbst besteht aus fünf kleinen Kernribonukleoproteinen (snRNPs, *engl. small nuclear ribonucleoproteins*) U1, U2, U5 und U4/U6, die in *S. cerevisiae* mit insgesamt ~90 Proteinen assoziiert sind (Fabrizio et al, 2009). In Mammalia sind nahezu doppelt so viele Proteine mit den snRNPs assoziiert, wodurch alternatives Spleißen ermöglicht wird (Deckert et al, 2006). Dieses tritt in Pilzen selten und in beiden Hefen, während der vegetativen Vermehrung, gar nicht auf (Grützmann et al, 2014). Jedes der fünf snRNPs setzt sich aus einer kleinen Kern RNA (snRNA, *engl. small nuclear RNA*), sieben Sm-Proteinen und einer unterschiedlichen Anzahl von partikelspezifischen Proteinen zusammen (Abbildung 3) (Jurica & Moore, 2003; Will & Lührmann, 2011). Zusätzlich zu diesen fünf snRNPs werden weitere nicht-snRNP assoziierte Proteine benötigt. Dazu gehören neben den SR- und SR-ähnlichen Proteinen auch eine Gruppe von Proteinen, die mit Prp19 (scPrp19/hsPRPF19) assoziiert sind und als *Nine Teen Complex* (NTC) bezeichnet werden (Jurica & Moore, 2003; Will & Lührmann, 2011).

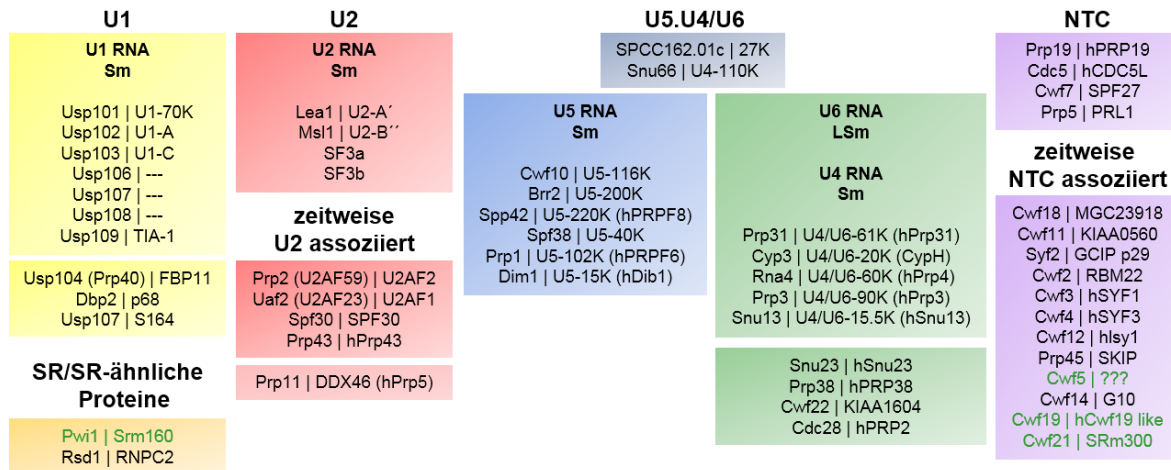


Abbildung 3| Proteine eines prä-katalytischen Spleißosoms (B-Komplex) aus *S. pombe*

In *S. pombe* Zellen wurde ein Prp1 Protein (scPrp6/U5-102K) exprimiert, welches eine Deletion ($\Delta 227-249$) im N-Terminus besitzt. Dies führt zur Akkumulation von prä-katalytischen Spleißosomen. Diese prä-katalytischen Spleißosomen wurden durch eine TAP-Aufreinigung isoliert (Lützelberger et al, 2010), die gebundenen Proteine massenspektroskopisch identifiziert und zugeordnet. Dabei wurden sowohl die Proteinennamen aus *S. pombe* (links, Bezeichnung nach Wood et al (2012)) als auch aus dem *Homo sapiens* (rechts, Bezeichnung nach Deckert et al (2006)) angegeben. grüne Schrift, Proteine, die nicht an einem prä-katalytischen Spleißosom in HeLa-Zellen zu finden sind. Lützelberger, M., unveröffentlichte Daten

Überwiegend auf der Grundlage von *in vitro* Experimenten ist ein Modell der Assemblierung des Spleißosoms entstanden, das einen schrittweisen Aufbau voraussetzt, der in Abbildung 4A schematisch dargestellt ist (Rino & Carmo-Fonseca, 2009). Zuerst erfolgt die Erkennung der 5'-SS durch den U1 snRNP, was zu einer Basenpaarung der U1 snRNA mit der 5'-SS führt (Séraphin et al, 1988; Siliciano & Guthrie, 1988; Zhuang & Weiner, 1986). Dadurch wird der Anfang der Intronsequenz markiert. Das Protein Bpb1 (scMsl5/hsSF1) bindet an die Sequenz um den BP und ein Heterodimer, bestehend aus Prp2 (scMud2/hsU2AF2) und Uaf2 (hsU2AF1), interagiert mit dem Pyrimidin-Trakt und der 3'-SS (Berglund et al, 1998; Berglund et al, 1997; Wu et al, 1999). Daraus entsteht der E-Komplex. Im Anschluss bindet der U2 snRNP an die BS, verdrängt Bpb1 vom BP, so dass ein prä-Spleißosom gebildet werden kann, das auch als A-Komplex bezeichnet wird (Parker et al, 1987; Wu & Manley, 1989). Die Anlagerung eines tri-snRNPs bestehend aus U5 und U4/U6 basengepaart sowie dem NTC vervollständigt das prä-katalytische Spleißosom (B-Komplex) (Görnemann et al, 2005; Tardiff & Rosbash, 2006; Will & Lührmann, 2011).

Da aus verschiedenen Organismen sowohl ein tetra-snRNP, bestehend aus U2.U5.U4/U6 (Carnahan et al, 2005; Gottschalk et al, 1999; Konarska & Sharp, 1988; Raghunathan & Guthrie, 1998), als auch ein funktionsfähiger penta-snRNP (U1.U2.U5.U4/U6) isoliert werden konnte (Stevens et al, 2002), scheint es *in vivo* möglich zu sein, dass sich die snRNPs, anders

als bei einem schrittweisen Aufbau, vorher als prä-katalytisches Spleißosoms zusammenlagern und dann an die prä-mRNA binden (Chen et al, 2007; Kotzer-Nevo et al, 2014).

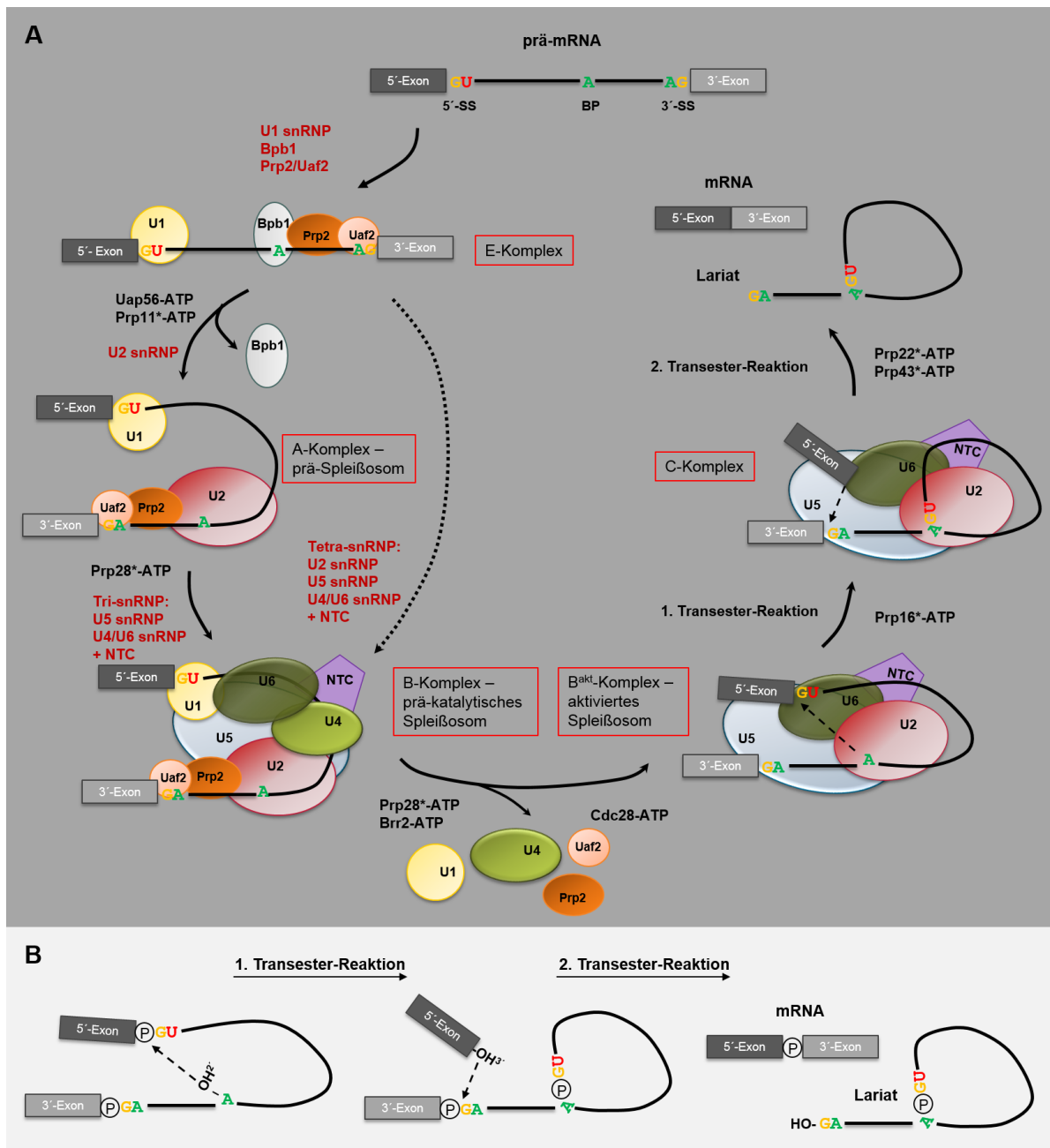


Abbildung 4| Schematische Darstellung des prä-mRNA Spleißens

(A) Schrittweiser Aufbau des Spleißosoms an einer prä-mRNA. Nach häufigen Veränderungen von Konformation und Zusammensetzung des Spleißosoms kann das Intron als Lariat entfernt und die beiden Exons miteinander verknüpft werden. Die fünf snRNPs sind mit U1, U2, U4, U5 und U6 beschriftet und als Ellipsen dargestellt. Nicht-snRNP Proteine (Bpb1, Prp2 und Uaf2) sowie der NTC sind gezeigt. Acht DexD/H RNA-Helikasen sind am Spleißprozess beteiligt und an ihrem jeweiligen Wirkungsort eingefügt. Diejenigen, für die eine Korrekturlese-Aktivität gezeigt werden konnte, sind mit einem „*“ markiert (Cordin & Beggs, 2013). Die Namen der Proteine entsprechen der *S. pombe* Nomenklatur (Wood et al, 2012). 5'-SS, 5'-Spleißstelle; 3'-SS, 3'-Spleißstelle und BP, Verzweigungspunkt. (B) Darstellung der zwei Transester-Reaktionen, bei denen das Intron herausgeschnitten und als Lariat freigesetzt wird. Die konservierten Nukleotide sind farblich hervorgehoben und die essentiellen funktionellen Gruppen sind angegeben; P, Phosphodiesterbindung; Die Abbildung wurde in Anlehnung an Wahl et al (2009) erstellt und modifiziert.

Nachdem der Aufbau abgeschlossen ist und sich das prä-katalytische Spleißosom (B-Komplex) an der prä-mRNA befindet, erfolgt eine Konformationsänderung (Abbildung 4A). Diese führt dazu, dass die snRNPs U1 und U4 das Spleißosom verlassen und der Komplex B* entsteht. Dieser geht nach Aktivierung direkt in den Komplex B^{Akt} über (Jurica & Moore, 2003; Wahl et al, 2009). Wie das Spleißosom aktiviert wird, ist bis heute nicht bekannt.

Nun kann die erste Spleißreaktion stattfinden (Abbildung 4B). Zuerst erfolgt durch die 2'-Hydroxylgruppe des BP-Adenosins ein nukleophiler Angriff auf die Phosphodiesterbindung der 5'-SS, wodurch die Exon-Intron-Verbindung am 5'-Ende gespalten wird. Gleichzeitig wird am BP eine neue Phosphodiesterbindung gebildet, so dass die Lariat-Struktur des Introns entsteht. Diese Konformation des Spleißosoms wird als C-Komplex bezeichnet. Nach einer weiteren Konformationsänderung kann die zweite Transester-Reaktion stattfinden. Ein zweiter nukleophiler Angriff erfolgt durch die 3'-Hydroxylgruppe des 5'-Exons auf die Phosphodiesterbindung der 3'-SS. Dies führt zur Ligation der beiden Exons und damit zur Bildung der reifen mRNA. Das Intron wird als Lariat freigesetzt und das Spleißosom abgebaut (Burge et al, 1999; Wahl et al, 2009).

Zusammen mit Proteinkinasen, Phosphatasen und GTPasen kontrollieren und verändern acht konservierte RNA-Helikasen RNA-RNA- und RNA-Protein-Interaktionen (Cordin & Beggs, 2013; Staley & Guthrie, 1998; Wahl et al, 2009). Dies ermöglicht die Konformationsänderungen des Spleißosoms, die sowohl für den Aufbau und die Spleißreaktion als auch für den Abbau nötig sind. Für fünf der acht am Spleißprozess beteiligten RNA-Helikasen (Abbildung 4A) konnte eine Korrekturlese-Aktivität gezeigt werden. Diese gewährleistet, dass ausschließlich solche prä-mRNAs den Spleißprozess durchlaufen, die stabile RNA-RNA- und RNA-Protein-Interaktionen eingehen können (Cordin & Beggs, 2013).

2.2 Intronerkennung und ihre Tücken

Welche Bedeutung eine stabile Interaktion der snRNAs mit der prä-mRNA hat, zeigt sich schon bei der Erkennung eines Introns. Die erste RNA-RNA-Interaktion im Spleißprozess, die den Anfang des Introns erkennt und festlegt, ist die Basenpaarung zwischen der prä-mRNA im Bereich des Exon1-Intron-Übergangs und der U1 snRNA (Abbildung 5A). Im optimalen Fall können sowohl die letzten drei Basen des Exon1 als auch die ersten sechs Basen des Introns, welche die 5'-SS bilden, mit neun Basen am 5'-Ende der U1 snRNA interagieren (Séraphin et al, 1988; Siliciano & Guthrie, 1988; Zhuang & Weiner, 1986).

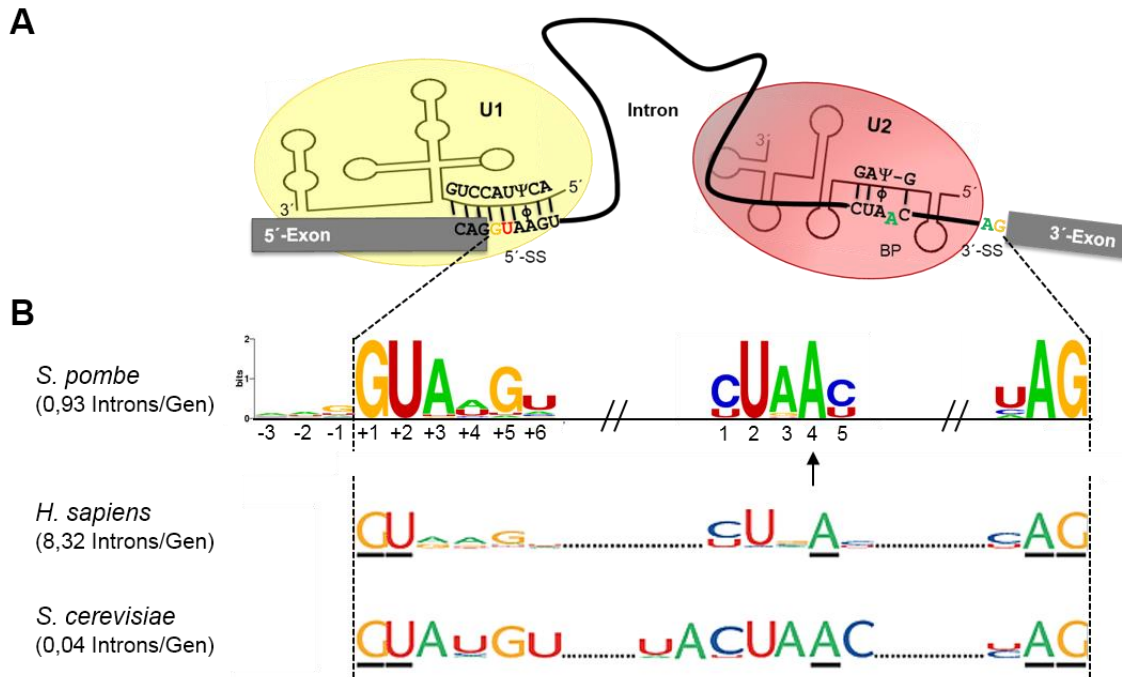


Abbildung 5 | RNA-RNA-Interaktionen bei der Intronerkenntung

(A) Bindung der snRNAs U1 und U2 an die prä-mRNA, so dass über komplementäre Basenpaarungen der Intronanfang und die BS erkannt werden. Konservierte Basen sind farblich hervorgehoben. | Watson-Crick-Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin; ϕ, Ψ-A Paarung (B) Evolutionäre Konservierung der Spleißstellen (5'-SS, 3'-SS) und des BP in *S. pombe*, *H. sapiens* und *S. cerevisiae*. Die Sequenzlogos für *S. pombe* wurden mit Weblogo3 erstellt (Crooks et al, 2004). Die Höhe der Buchstaben repräsentiert den Grad der Konservierung der Base an dieser Position. Die Positionen der Basen im Exon1 besitzen negative Positionszahlen, die innerhalb des Introns positive. Die Nummerierung der BS beginnt neu bei 1. Der Pfeil markiert den BP. Die Abbildung der Sequenzlogos für *H. sapiens* und *S. cerevisiae* wurden Anthony und Pomeranz Krummel (2013) entnommen und modifiziert. Zu jedem Organismus wurde die Anzahl der Introns pro Gen angegeben (Schwartz et al, 2008).

Während die Sequenz der U1 snRNA immer die gleiche ist, sind viele Exon1/5'-Spleißstellen der Introns nicht konserviert und damit auch nicht komplementär zur U1 snRNA (Abbildung 5B). Die letzten drei Nukleotide des Exon1 sind Teil der kodierenden Sequenz des Gens und daher ohnehin eher zufällig (Schwartz et al, 2008). Innerhalb des Introns befinden sich an den Positionen +1 und +2 in nahezu allen Introns ein Guanin und ein Uracil und an Position +5 meistens auch ein Guanin, doch die restlichen drei Basen der 5'-SS sind je nach Organismus mehr oder weniger stark konserviert (Abbildung 5) (Roy & Irimia, 2009; Schwartz et al, 2008). Allein im Menschen gibt es mehr als 9000 verschiedene Sequenzen der Exon1/5'-SS (Roca et al, 2012). Es hat sich gezeigt, dass die Konservierung der Spleißstellen mit der Anzahl der Introns korreliert. Bei einem Vergleich von intronarmen (< 0,2 Introns/Gen im Durchschnitt) und intronreichen Organismen, zeigen die Spezies mit wenigen Introns im Genom eine starke Konservierung der 5'-SS und auch der BS (Irimia et al, 2007; Irimia & Roy, 2008; Irimia et al, 2009; Schwartz et al, 2008). Diese Tendenz wird deutlich, wenn die Sequenzen der Spleißstellen intronreicher Organismen, wie *S. pombe* und *Homo sapiens*, denen der

intronarmen *S. cerevisiae* gegenüber gestellt werden (Abbildung 5B). In der intronarmen *S. cerevisiae* besitzen mehr als 75 % der 5'-Spleißstellen das Motiv GUAUGU. Und auch die restlichen 25 % weichen meist nur in einer Base von dieser Konsensussequenz ab (Roy & Irimia, 2014). In der intronreichen *S. pombe* können an den Positionen +4 und +6 alle Nukleotide auftreten und im *H. sapiens* sind sogar nur die ersten beiden Basen der 5'-SS konserviert (Abbildung 5).

Die zweite snRNA-prä-mRNA-Interaktion, die von Bedeutung ist, ist die Bindung der U2 snRNA an die BS des Introns (Abbildung 5A) (Parker et al, 1987; Wu & Manley, 1989). In den intronreichen Organismen, wie *S. pombe* und *H. sapiens*, besteht die Sequenz aus fünf Basen, die bis auf das Uracil an Position 2 und das Adenin an Position 4 wenig Konservierung aufweist (Gao et al, 2008; Schwartz et al, 2008). Bei der Interaktion der U2 snRNA mit der BS können hier bis zu vier Basenpaare gebildet werden, die dazu führen, dass das ungepaarte Adenosin des BPs an Position 4 der BS für den späteren nukleophilen Angriff positioniert wird (Newby & Greenbaum, 2002; Query et al, 1994). In Hemiascomyceten wie *S. cerevisiae* ist die BS ein konservierter 7-mer (UACUAAC), der in ~86 % der Introns auftritt und vollständig komplementär zur dieser Region der U2 snRNA ist (Bon et al, 2003).

2.3 SR-Proteine: Helfer bei der Intronerkennung

Die geringe Konservierung der Spleißstellen in intronreichen Organismen macht die Erkennung eines Introns komplizierter. Aus diesem Grund besitzt die Zelle Mechanismen, die die Bindung der snRNAs an die prä-mRNA unterstützen und stabilisieren. Dazu gehören die SR-Proteine (Abbildung 6). Diese binden über RNA-Bindedomänen an ESE-Sequenzen (*engl. Exonic Splicing Enhancer*) im Exon, interagieren mit spleißosomalen Proteinen und stabilisieren so deren Bindung an die prä-mRNA (Graveley, 2000). Sowohl die Lokalisation innerhalb der Zelle als auch ihre Bindung an die prä-mRNA wird durch Phosphorylierung reguliert (Cho et al, 2011; Tang et al, 2007).

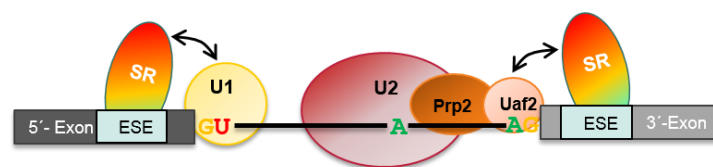


Abbildung 6| SR-Proteine verbessern die Erkennung von Introns

Im Exon bindende SR-Proteine interagieren mit spleißosomalen Proteinen und ermöglichen und/oder stabilisieren deren Bindung an die prä-mRNA. ESE, *exonic splicing enhancer*; Die Abbildung wurde in Anlehnung an Zhou and Fu (2013) erstellt und modifiziert

Es ist bekannt, dass beispielsweise das SR-Protein ASF/SF2 in Mammalia mit dem U1 Protein hsU1-70K (spUsp101/scSnp1) interagiert und dadurch die Bindung des U1 snRNPs an die Exon1/5'-SS stabilisiert (Jamison et al, 1995; Kohtz et al, 1994; Staknis & Reed, 1994). Auch bei der Erkennung des 3'-Endes sind SR Proteine beteiligt. Das SR Protein SC35 interagiert in HeLa-Zellen mit hsU2AF1 (spUaf2) und verstärkt dessen Bindung an der 3'-SS (Zuo & Maniatis, 1996). In *S. pombe* erfüllt das SR-Protein Srp2 (hsSRSF4/5/6) diese Aufgabe (Webb & Wise, 2004). Zwei SR-Proteine sind in *S. pombe* bekannt, Srp1 (hsSRSF2) und Srp2 (hsSRSF4/5/6), während es in Mammalia 12 gibt, die vermutlich durch Genverdopplung entstanden sind (Busch & Hertel, 2012; Groß et al, 1998; Lützelberger et al, 1999; Plass et al, 2008). In Mammalia spielen sie eine wichtige Rolle im konstitutiven und alternativen Spleißen (Busch & Hertel, 2012).

2.4 Pseudouridine (Ψ) in spleißosomalen snRNAs

Eine der am häufigsten auftretenden Modifikation von RNA ist die Pseudouridinylierung (Cohn, 1959; Lane, 1998). Pseudouridine (Ψ) sind sowohl in tRNAs und rRNAs als auch in ncRNAs, mRNAs und snRNAs zu finden (Carlile et al, 2014; Karijolic & Yu, 2010; Reddy & Busch, 1988). Pseudouridine entstehen durch eine Isomerisierungs-Reaktion (Abbildung 7). Diese wird entweder durch einen RNA-abhängigen Mechanismus (Box H/ACA RNP) oder durch Pseudouridinsynthasen (Pus) und damit RNA-unabhängig katalysiert (Ganot et al, 1997; Ma et al, 2005; Ma et al, 2003; Massenet et al, 1999; Ni et al, 1997). Zusätzlich zur konstitutiven Pseudouridinylierung hat sich in den letzten Jahren herausgestellt, dass die Bildung von Pseudouridinen auch durch unterschiedliche Stressbedingungen induziert werden kann (Adachi & Yu, 2014).

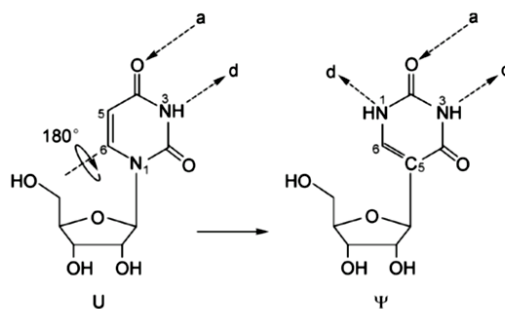


Abbildung 7| Schematische Darstellung der Isomerisierung von Uridin (U) zu Pseudouridin (Ψ)

Die Isomerisierungs-Reaktion wandelt Uridin (U) in Pseudouridin (Ψ) um. Pseudouridine haben einen Donor (d) für eine Wasserstoffbrückenbindung mehr als Uridine, während die Anzahl der Akzeptoren (a) gleich bleibt. Die Ringatome der Basen sind nummeriert. Die Abbildung wurde von Yu et al (2011) übernommen.

Es wird dabei zuerst die glykosidische Bindung (N1-C1') zwischen dem Zucker und der Base Uracil aufgebrochen. Die Base Uracil dreht sich um 180 °, was zu einer neuen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung (C5-C1') zwischen Base und Zucker führt (Abbildung 7) (Gu et al, 1999). Ein wichtiger Unterschied zwischen Uridin und Pseudouridin ist die zusätzliche Aminogruppe (-NH₂) der Pseudouridine, durch die ein weiterer Donor für eine Wasserstoffbrückenbindung entsteht. Das Pseudouridin kann so durch ein Wassermolekül eine Bindung mit dem Phosphat-Sauerstoff seines Ribose-Rückgrats eingehen und die RNA damit stabiler und starrer machen. Die erhöhte Stabilität, aufgrund der veränderten RNA-Struktur, kann letztlich auch die Funktion der RNA beeinflussen (Arnez & Steitz, 1994; Charette & Gray, 2000; Davis, 1995).

Wird die thermodynamische Stabilität der Basenpaarung von Pseudouridin gepaart mit Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) oder Uracil (U) verglichen, ist zwischen A-Ψ und G-Ψ die stabilste Interaktion zu finden (Kierzek et al, 2014). Insgesamt führt eine Basenpaarung, an der ein Pseudouridin beteiligt ist, zu einer höheren Stabilität der doppelsträngigen RNA, als ein Uridin an derselben Position. Die Stabilität wird allerdings, genau wie bei Watson-Crick-Paarungen, auch noch von den angrenzenden Nukleotiden beeinflusst (Kierzek et al, 2014; Xia et al, 1998).

Die meisten Pseudouridine finden sich in Bereichen der snRNAs, die mit der prä-mRNA interagieren oder aber für eine Interaktion der snRNAs miteinander von Bedeutung sind. Das führte zu der Annahme, dass sie beim prä-mRNA Spleißen eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu den snRNAs in Vertebraten, bei denen in allen fünf snRNAs Pseudouridine auftreten, sind sie in *S. pombe* nur in den snRNAs U1, U2 und U5 zu finden (Abbildung 8) (Gu et al, 1996; Reddy & Busch, 1988; Yu et al, 2011). Die U1 snRNA besitzt in *S. pombe*, im Gegensatz zu Vertebraten, Mammalia und der Bäckerhefe, ein Pseudouridin, welches sich bei der Interaktion der snRNA mit der 5'-SS gegenüber der variablen Position +4 der 5'-SS befindet (Abbildung 5A). Ob das Pseudouridin der U1 snRNA für den Spleißprozess eine bestimmte Funktion hat, ist bisher nicht bekannt. Die U2 snRNA enthält von allen snRNAs sowohl in Mammalia als auch in der Hefe, die meisten Pseudouridine, wobei auch hier in *S. pombe* weniger vorhanden sind (Adachi & Yu, 2014; Gu et al, 1996). Das Pseudouridin gegenüber der BS ist hier essentiell um das BP-Adenosin auszustülpen und den ersten nukleophilen Angriff zu ermöglichen (Newby & Greenbaum, 2002; Query et al, 1994).

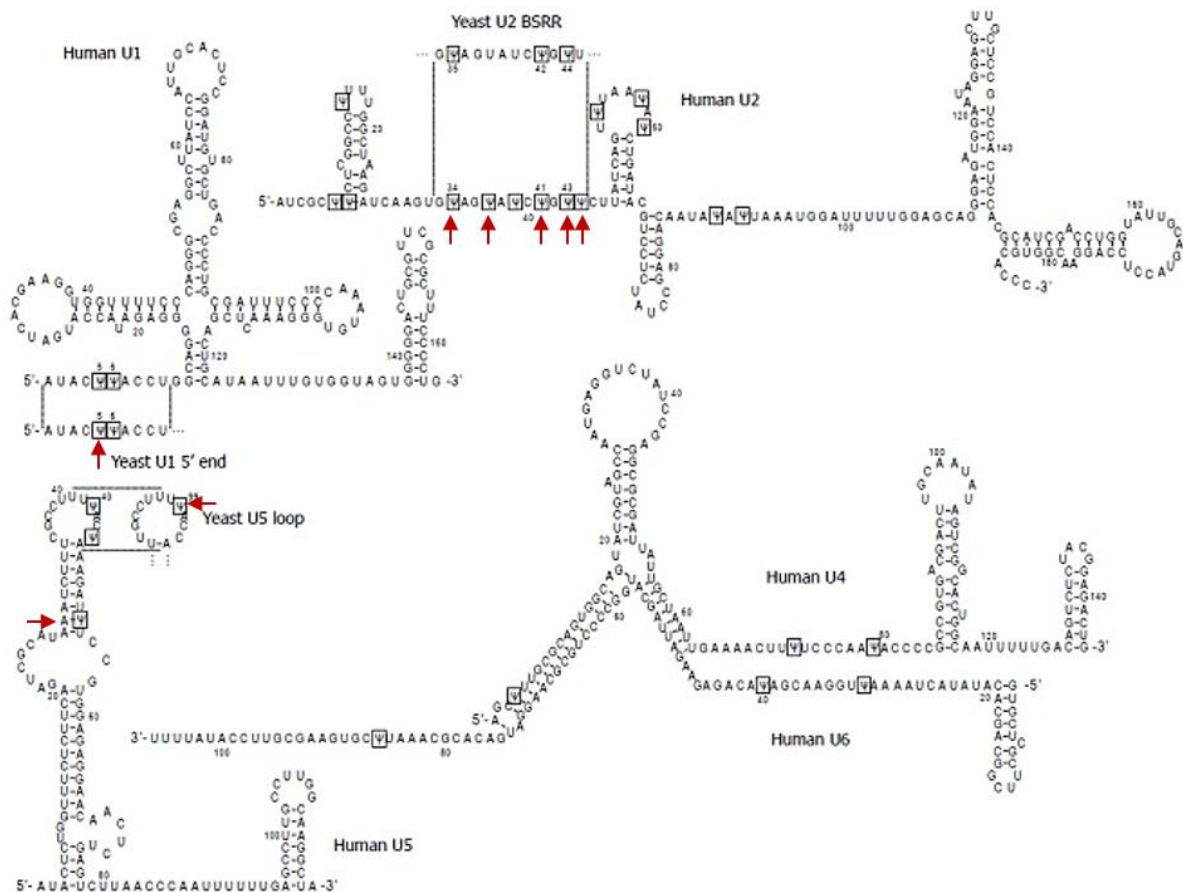


Abbildung 8 | Primäre Sequenz und Sekundärstruktur von spliceosomalen snRNAs aus *H. sapiens*

Die in den snRNAs (U1, U2, U5, U4/U6) auftretenden Pseudouridine (Ψ) sind mit einem Rahmen hervorgehoben. Die Sequenzausschnitte, an denen die snRNAs von *S. cerevisiae* Pseudouridine enthalten sind mit angegeben. Die roten Pfeile zeigen die Stellen, an denen sich nach Gu et al (1996) in *S. pombe* Pseudouridine befinden. Die Abbildung wurde von Adachi und Yu (2014) übernommen und modifiziert.

3 Prp4, eine Serin/Threonin Kinase

Im Genom von *S. pombe* sind 107 Proteinkinasen kodiert, wovon 17 essentiell für das Zellwachstum sind (Cipak et al, 2011). Eine dieser Kinasen ist die in dieser Arbeit untersuchte essentielle Serin/Threonin Kinase Prp4 (hsPRPF4B) (Alahari et al, 1993). Das Gen, welches für die Prp4 Kinase kodiert, wurde bei der Suche nach temperatursensitiven Mutanten identifiziert, die einen Defekt in der prä-mRNA Prozessierung (prp, engl. *pre-mRNA processing*) zeigen. Bei einem Shift der Zellen zur restriktiven Temperatur von 36 °C führt das mutierte Allel *prp4-73^{ts}* zu einem Wachstumsstopp in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus und zu einer Akkumulation von prä-mRNA, was auf eine Funktion im Spleißprozess hindeutet (Rosenberg et al, 1991; Schwelnus et al, 2001).

3.1 Der Aufbau der Prp4 Kinase

Die Kinase Prp4 gehört zur Familie der DYRK (*engl. dual-specificity tyrosine-regulated kinases*) (Alahari et al, 1993; Aranda et al, 2011). Diese werden als dual-spezifische Proteinkinasen definiert, weil sie eine Phosphatgruppe sowohl auf Serin und Threonin als auch auf Tyrosin übertragen können. Die Phosphorylierung eines Tyrosins beschränkt sich allerdings auf einen Autophosphorylierungs-Prozess während der Reifung des Proteins (Aranda et al, 2011; Groß et al, 1997; Lochhead et al, 2005).

Die Prp4 Kinase aus *S. pombe* hat eine Größe von 55 kDa. Die ersten 158 Aminosäuren werden einem N-terminalen Bereich zugeordnet und die restlichen 319 Aminosäuren bilden die katalytische Kinasedomäne (Abbildung 9). Der N-terminale Bereich der Prp4 Kinase ist in *S. pombe* im Vergleich zu anderen Organismen kürzer (Kuhn & Käufer, 2003). Er enthält insgesamt vier Elemente, wobei für drei davon gezeigt wurde, dass diese für die Funktion der spPrp4 Kinase essentiell sind. Dazu gehören die beiden Serin-Elemente SX1 (SDSPSI) und SX2 (SPSPSV), wobei nur SX1 auch in anderen Organismen zu finden ist. Das dritte Element EGY, das Teil der DYRK-Homologie-Box ist, befindet sich nahe der Kinasedomäne und ordnet Prp4 der dritten Subfamilie der DYRKs zu, den Prp4s (*engl. pre-mRNA processing protein 4 kinases*) (Aranda et al, 2011; Groß et al, 1997). Ein viertes Element, das Sequenzmotiv DDMFA, ist ebenfalls hoch konserviert. Im Gegensatz zur Prp4 Kinase aus *S. pombe* befindet sich in höheren Eukaryoten im N-Terminus eine RS Domäne und eine Histidin/Lysin-reiche Region. Dieser verlängerte N-Terminus ermöglicht Interaktionen mit anderen Proteinen, sowie die Lokalisation der hsPrp4 Kinase in *nuclear speckles* (Dellaire et al, 2002).

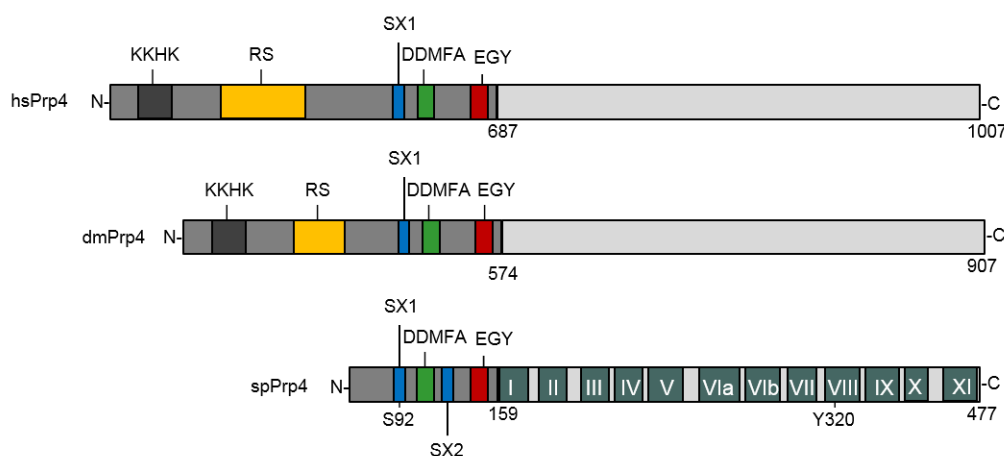


Abbildung 9| Struktur der Prp4 Kinase

Schematische Darstellung des N-terminalen Bereichs mit den verschiedenen Elementen und der Kinasedomäne der Prp4 Kinase aus *H. sapiens* (hs), *Drosophila melanogaster* (dm) und *S. pombe* (sp) im Vergleich. Die Zahlen unter dem Schema geben die Position der Kinasedomäne, sowie die Gesamtlänge des Proteins an. Bei der Kinasedomäne der spPrp4 ist die Einteilung in 12 Subdomänen nach Hanks und Hunter (1995) mit angegeben. Die einzelnen Domänen sind mit römischen Zahlen nummeriert. Die Phosphorylierungsstellen der spPrp4 Kinase (S92 und Y320) sind markiert.

Die Kinasedomäne, die die katalytische Aktivität vermittelt, lässt sich nach Hanks and Hunter (1995) in 12 Subdomänen unterteilen, die charakteristische Aminosäurereste beinhalten. Die Subdomänen I-IV sind für die ATP (Adenosintriphosphat)-Bindung verantwortlich, während VIa-XI an der Peptid-Bindung und dem Phosphattransfer beteiligt sind. Die Spalte zwischen Domäne IV und VIa bildet das aktive Zentrum (Hanks & Hunter, 1995). Die spPrp4-Kinase selbst besitzt zwei Phosphorylierungsstellen, zum einen das Tyrosin an Position 320, das durch die Kinase selbst phosphoryliert wird und ein Serin an Position 92, das sich in dem Serinreichen Element SX1 am N-Terminus befindet (Wilson-Grady et al, 2008).

3.2 Die Substrate der Prp4 Kinase

Für die Prp4 Kinase aus *S. pombe* konnten bisher zwei Substrate identifiziert werden, die am Spleißprozess beteiligt sind. Das erste Substrat, ist das spleißosomale Protein Prp1 (scPRP6/hsU5-102K), welches von Prp4 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert wird (Schwelnus et al, 2001). Hier konnte in *S. pombe* und Mammalia eine physische Interaktion von Substrat und Kinase gezeigt werden (Dellaire et al, 2002; Schwelnus et al, 2001). Bei dem zweiten Substrat handelt es sich um das SR-Protein Srp2 (hsSRSF4/5/6), bei dem *in vitro* die Phosphorylierung durch Prp4 gezeigt wurde (Lützelberger & Käufer, 2012).

3.2.1 Das spleißosomale Protein Prp1

Prp1 (scPRP6/hsU5-102K) ist ein spleißosomales Protein, welches den U5 snRNP mit den snRNPs U4/U6 verbindet und von Prp4 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert wird (Galisson & Legrain, 1993; Liu et al, 2006; Schwelnus et al, 2001).

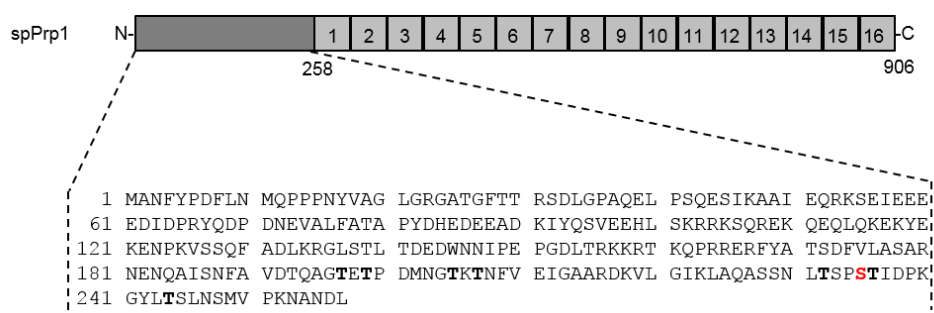


Abbildung 10| Struktur und Phosphorylierungsstellen von Prp1

Schematische Darstellung von Prp1 aus *S. pombe*. Die Aminosäuresequenz des N-Terminus ist angegeben und die Phosphorylierungsstellen hervorgehoben; schwarz dick gedruckt nach Lützelberger et al (2010) und rot nach Carpy et al (2014); der C-Terminus ist in TPRs (*tetra-trico peptide repeats*) unterteilt, die von 1-16 nummeriert sind. Die Länge des N-Terminus, sowie die Gesamtlänge des Proteins sind angegeben.

Das Protein gliedert sich in einen N-Terminus, in dem sich die Phosphorylierungsstellen befinden und einen konservierten C-Terminus, der sich in 16 TPRs (*engl. tetra-trico peptide repeats*) aufteilen lässt (Abbildung 10) (Lützelberger et al, 2010; Schneider et al, 2010; Schwelnus et al, 2001). TPRs ermöglichen die Interaktion mit anderen Proteinen und bilden aufgrund ihrer Struktur häufig eine Plattform für den Aufbau von Multi-Protein-Komplexen (Zeytuni & Zarivach, 2012).

Bei verschiedenen temperatursensitiven Allelen von *prp1*, die durch Mutationen im C-Terminus entstanden sind, arretieren die Zellen nach Shift zur restriktiven Temperatur in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus und zeigen eine Akkumulation von prä-mRNA (Schwelnus et al, 2001). Deletionen in der konservierten TPR-Region im C-Terminus von Prp1 führen dazu, dass das mutierte Protein nicht mehr an spleißosomale Komplexe binden kann. Werden dagegen verschiedene Bereiche des N-Terminus deletiert, der die Phosphorylierungsstellen enthält, kann Prp1 weiterhin an spleißosomale Komplexe binden, wobei ein prä-katalytisches Spleißosom entsteht (Abbildung 3). Allerdings kann keine Spleißreaktion mehr stattfinden und prä-mRNA akkumuliert. Das deutet daraufhin, dass Prp1 schon früh beim Aufbau des Spleißosoms eine Rolle spielt und die Integrität des N-Terminus bei der Aktivierung von Bedeutung ist (Lützelberger et al, 2010). Auch in HeLa-Zellen ist die Phosphorylierung von Prp1 durch Prp4 notwendig um die Interaktion des tri-snRNPs (U5.U4/U6) mit dem prä-Spleißosom zu stabilisieren, damit ein prä-katalytisches Spleißosom (U1.U2.U5.U4/U6) aufgebaut werden kann (Schneider et al, 2010).

3.2.2 Srp2- ein SR-Protein

Schon 1997 haben Groß et al gezeigt, dass die spPrp4 Kinase *in vitro* die RS-Domäne des Proteins ASF/SF2 aus Mammalia phosphoryliert. Sowohl ASF/SF2 als auch Srp2 (hsSRSF4/5/6), das zweite bekannte Substrat der Kinase, werden zur Superfamilie der SR-Proteine gezählt. SR-Proteine bestehen aus ein oder zwei N-terminalen RNA-Bindedomänen (RBD) und Arginin/Serin-reichen (RS) Domänen am C-Terminus (Busch & Hertel, 2012). In *S. pombe* wurden zwei SR-Proteine, Srp1 (hsSRSF2) und Srp2 (hsSRSF4/5/6), identifiziert, die einzeln aber auch als Komplex vorkommen können (Groß et al, 1998; Lützelberger et al, 1999; Tang et al, 2002). Srp1 ist nicht essentiell, besitzt eine RBD und drei Arginin/Serin-reiche RS-Elemente. Srp2 dagegen ist essentiell. Es besitzt zwei RBDs, sowie C-terminal zwei SR-Elemente, die von einer typischen RS-Domäne abweichen, da sie durch einen Arginin-reichen Abschnitt unterbrochen sind (Lützelberger et al, 1999).

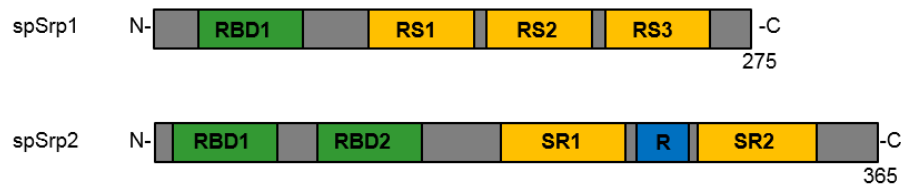


Abbildung 11| Struktur der SR-Proteine Srp1 und Srp2

Schematische Darstellung der SR-Proteine Srp1 und Srp2 aus *S. pombe*. RBD, RNA-Bindedomäne; RS, Arginin/Serin-reiche Domäne; SR, Serin/Arginin-reiches Element; R, Arginin-reiche Sequenz, N- und C-Terminus, sowie die Gesamtlänge des Proteins sind angegeben.

Tang et al (2007) hat gezeigt das Srp2 im Zytoplasma durch die nicht-essentielle Kinase Dsk1 (hsSRPK1/2/3/scSKY1) phosphoryliert werden muss, damit es in den Zellkern transportiert wird. Im Gegensatz zur Kinase Dsk1, welche sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern befindet, ist Prp4 hauptsächlich im Nukleus lokalisiert (Richert, 2002). In Kinaseassays konnte *in vitro* ebenfalls gezeigt werden, dass Dsk1 beide SR-Proteine phosphoryliert, während sich die Phosphorylierung durch Prp4 ausschließlich auf Srp2 beschränkt (Lützelberger & Käufer, 2012). Wird im Einzelnen untersucht welche Aminosäurereste der SR-Elemente von Srp2 phosphoryliert werden, zeigen beide Kinasen überraschenderweise das gleiche Ergebnis. Beide SR-Domänen, sowie zwei weitere Serine, die an die zweite SR-Domäne angrenzen, werden phosphoryliert (Lützelberger & Käufer, 2012). Während die Phosphorylierung der beiden SR-Elemente notwendig für den Transport in den Nukleus ist, verleiht die RBD2 Srp2 seine Spezifität (Lützelberger et al, 1999).

In weiteren Untersuchungen wurde in *S. pombe* eine genetische Interaktion von Prp4 mit anderen spleißosomalen Proteinen gezeigt. Dazu gehören die Proteine Brr2 (scBrr2/hsU1-200K), Spp42 (scPrp8/hsPRPF8) und Prp31 (scPrp31/hsPrp31), die alle Teil eines tri-snRNP sind (Bottner et al, 2005).

4 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit wird untersucht, welche Rolle die Serin/Threonin Kinase Prp4 bei der Assemblierung und/oder Aktivierung des Spleißosoms spielt. Dazu wird ein Hefestamm konstruiert, der eine analog-sensitive Prp4 Kinase exprimiert, Prp4_{as2}, die sich durch Zugabe eines ATP-Analogons inhibieren lässt. Im Anschluss wird der Einfluss der Kinaseaktivität auf den Spleißprozess untersucht. Dabei wird nach Inhibition der Kinase die Spleißeffizienz einzelner Introns mittels RT-PCR betrachtet und in einem ganzheitlichen Ansatz die Sequenzierung der Gesamt-RNA durchgeführt. Die Introns werden in zwei Klassen eingeordnet: (1) Prp4-abhängig gespleißte Introns, die die Kinase benötigen, um gespleißt zu werden und (2) Prp4-unabhängig gespleißte Introns, die trotz Inhibition der Kinase effizient gespleißt werden. Der Unterschied zwischen den beiden Intronklassen ist, dass die Exon1/5'-SS und BS der Prp4-abhängig gespleißten Introns häufiger von der Konsensussequenz abweicht, als die Prp4-unabhängig gespleißten Introns. Damit überprüft werden kann, ob die Sequenz der Spleißstellen die Abhängigkeit von der Prp4-Kinase beeinflusst, wird aus jeder Intronklasse ein intronhaltiges Gen ausgewählt (*res1* und *ppk8*) und als Reportergen in den *leu1*-Lokus der Hefe integriert. Anhand dieser beiden Reportergene soll eine Mutationsanalyse durchgeführt werden, die untersucht, ob durch Mutagenese der Exon1/5'-SS und der BS ein Prp4-abhängiges Intron in ein Prp4-unabhängiges Intron umgewandelt werden kann und umgekehrt. Dazu wird in dem Prp4-abhängig gespleißten Reportergen *res1*' die Komplementarität der Exon1/5'-SS zur U1 snRNA erhöht und in dem Prp4-unabhängigen Reportergen *ppk8*' verringert. Um auch den Einfluss der BS auf die Prp4-Abhängigkeit zu überprüfen, werden hier Mutationen gesetzt, die die Komplementarität zur U2 snRNA verringern. Im Anschluss wird die Spleißeffizienz der einzelnen Konstrukte ohne und mit Inhibition der Kinase durch RT-PCR untersucht.

II Ergebnisse

Die bisherigen Versuche, die Prp4 Kinase *in vivo* zu inaktivieren und damit ihrer Funktion im Spleißprozess näher zu kommen, sind mit dem temperatursensitiven Allel *prp4-73^{ts}* durchgeführt worden (Rosenberg et al, 1991). Dabei wurde gezeigt, dass die Zellen nach einem Shift zur restriktiven Temperatur von 36 °C das Zellwachstum einstellen und prä-mRNA akkumuliert (Schwelnus et al, 2001). Allerdings kommt der Shift zu 36 °C einem Hitzeschock gleich, bei dem zusätzliche Stresseffekte nicht ausgeschlossen sind. Um diese zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit eine chemisch-genetische Strategie gewählt, bei dem eine analog-sensitive (as) Prp4 Kinase konstruiert wurde, die durch einen ATP-analogen Inhibitor gehemmt werden kann.

1 Konstruktion einer analog-sensitiven Prp4 Kinase

Bei as-Kinasen wird eine sperrige Aminosäure wie z. B. Methionin, Leucin oder Phenylalanin, die sogenannte „Gate-Keeper“ Aminosäure, die sich an einem strukturell sehr konservierten Bereich der ATP-Bindetasche befindet, durch eine kleine Aminosäure wie Alanin oder Glycin ersetzt (Abbildung 12).

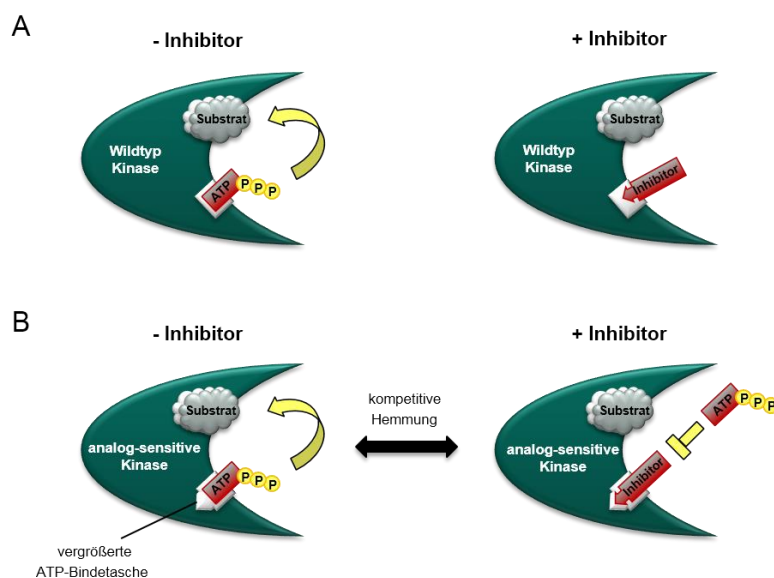


Abbildung 12| Kompetitive Hemmung von analog-sensitiven Kinasen

Schematische Darstellung der selektiven Hemmung von analog-sensitiven Kinasen durch einen ATP analogen Inhibitor. A) Alle Wildtyp-Kinasen der Zelle werden von dem ATP-Analogen nicht beeinträchtigt, da ausschließlich ATP in die Bindetasche gelangen kann. B) Wird die Bindetasche durch Mutation vergrößert, können sowohl das ATP-Analogen, als auch ATP binden. Bindet das ATP-Analogen kommt es zur Inhibition der Kinase

Dadurch vergrößert sich die ATP-Bindetasche und neben ATP kann auch ein ATP-analoger Inhibitor binden, der einen zusätzlichen organischen Rest besitzt. Die Mutation der

„Gate-Keeper“ Aminosäure überträgt zwar die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor, beeinträchtigt in Abwesenheit des Inhibitors jedoch nicht die Funktion der Kinase (Liu et al, 1999; Zhang et al, 2013). Der Inhibitor bindet ausschließlich in der mutierten ATP-Bindetasche und nicht in der Bindetasche der Wildtyp Kinase, da es sonst zu einem räumlichen Zusammenstoß des Inhibitors mit der „Gate-Keeper“ Aminosäure käme. Die as-Kinasen können damit spezifisch durch Zugabe unterschiedlicher Mengen des Inhibitors, sowohl vollständig als auch teilweise inhibiert werden. Bei dem Inhibitor handelt es sich um kleine Moleküle, die schnell in die Zelle gelangen können und damit eine Inaktivierung des Zielproteins in sehr kurzer Zeit ermöglichen. Die Zelle hat damit kaum Zeit, der fehlenden Kinaseaktivität entgegenzuwirken und sich anzupassen (Gregar et al, 2007).

Damit ein Hefestamm konstruiert werden kann, der ausschließlich eine analog-sensitive Prp4 Kinase exprimiert, wurde die „Gate-Keeper“ Aminosäure durch Sequenzvergleiche identifiziert (<http://sequoia.ucsf.edu/ksd/>) (Abbildung 13).

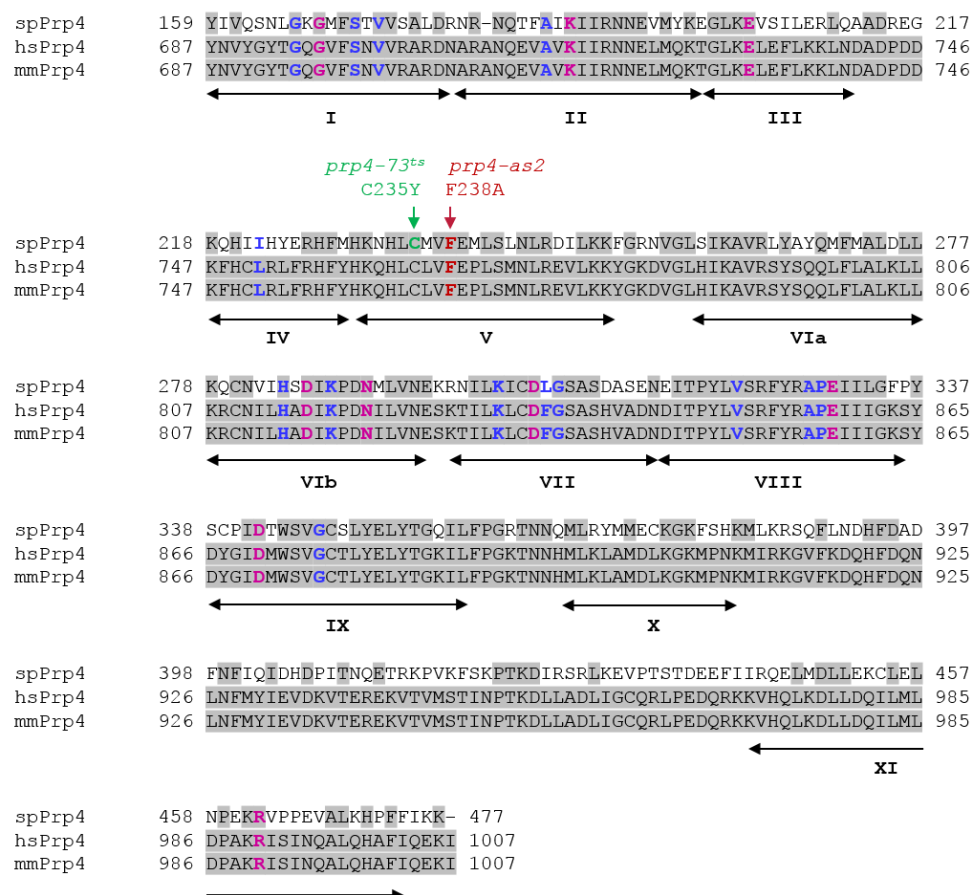


Abbildung 13| Alignment der Kinasedomäne von Prp4 in verschiedenen Organismen

Zwischen den drei Organismen konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Konservierte Aminosäuren, die für bestimmte Subdomänen charakteristisch sind, sind dick gedruckt und farblich hervorgehoben. Magenta, invariante Aminosäure; Blau, nahezu invariante Aminosäure; Die einzelnen Subdomänen sind durch Pfeile angezeigt und mit römischen Ziffern beschriftet (Aranda et al, 2011; Hanks & Hunter, 1995); sp, *S. pombe*; hs, *H. sapiens*; mm, *Mus musculus*,

Die in Abbildung 13 dargestellte Kinasedomäne von Prp4 ist zu 53 % identisch mit der des homologen Proteins in Mensch und Maus. Bei Prp4 aus *S. pombe* befinden sich sowohl die „Gate-Keeper“-Aminosäure wie auch die Punktmutation, die in *S. pombe* zu dem temperatursensitiven Allel *prp4-73^{ts}* (C235Y) führt, in Subdomäne V der Kinasedomäne. Bei der „Gate-Keeper“-Aminosäure handelt es sich in allen drei Organismen um ein Phenylalanin (F). In *S. pombe* befindet es sich an Position 238 und wurde in ein Alanin (A) mutiert, was zu der Bezeichnung *prp4_{as2}* führt (Abbildung 13).

Durch homologe Rekombination wurde das Gen *prp4* im Wildtyp-Lokus durch das mutierte Allel der Kinase und einer dem Terminationsbereich angefügte Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt (Abbildung 14 und IV3.1, S. 81). Dabei ist der Stamm 801 *h^{-s} prp4:int::prp4_{as2}-kan^R* entstanden. Zusätzlich wurde ein Kontrollstamm hergestellt, der die Stammnummer 796 und folgenden Genotyp *h^{-s} prp4:int::prp4⁺-kan^R* hat. Die Zellen dieses Stamms besitzen das *prp4* Wildtyp-Allel sowie die Kanamycin-Resistenzkassette, die auch hier zwischen dem Terminationsbereich und der 3'-flankierenden Sequenz eingefügt wurde. Diese Zellen sollten nicht vom Inhibitor beeinflusst werden.

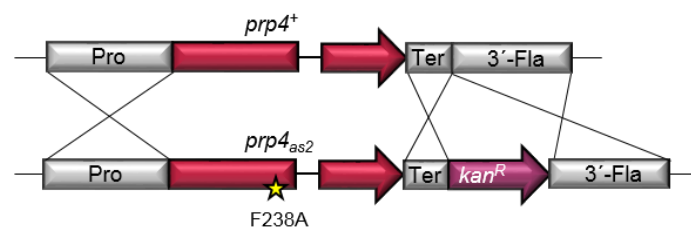


Abbildung 14| Integration des *prp4_{as2}*-Konstrukts in den *prp4⁺*-Lokus

An das mutierte *prp4_{as2}* Allel wurde C-terminal eine Resistenzkassette (*kan^R*) angefügt und das gesamte Konstrukt in den Wildtyp-Lokus integriert; Pro, Promotor; Ter, Terminationsbereich; 3'-Fla, 3'-flankierende Region; Stern, Mutation (F238A)

2 Der Inhibitor 1NM-PP1 hemmt die Prp4_{as2} Kinase

Da drei verschiedene Inhibitoren zur Verfügung stehen, die in diesem Abschnitt kurz beschrieben werden, musste zunächst untersucht werden ob und unter welchen Bedingungen, diese drei Inhibitoren einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität der Prp4_{as2} Kinase haben und damit das Wachstum der Zellen beeinflussen. Dazu wurden sowohl auf Festmedien Tropftests als auch verschiedene Wachstumsreihen in Flüssigkultur durchgeführt.

2.1 Die Inhibitoren

Die Strukturformeln der drei verwendeten ATP-analogen Inhibitoren sind in Abbildung 15 im Vergleich zu ATP dargestellt. Diese drei Inhibitoren gehören zu einer Gruppe von Inhibitoren, die von Kevan M. Shokat verwendet wurden, der zuerst die analog-sensitiven Kinasen in *S. pombe* untersucht hat (Bishop et al, 2000; Gregan et al, 2007). Die Inhibitoren bestehen aus einem Pyrazolpyrimidin, welches den Adeninring des ATP's imitiert, während die Naphtyl-, Naphthylmethyl- oder 3'-Methylbenzyl-Gruppe in die hydrophobe Tasche hineinragt (Schindler et al, 1999; Zhang et al, 2013; Zhang & Shokat, 2007).

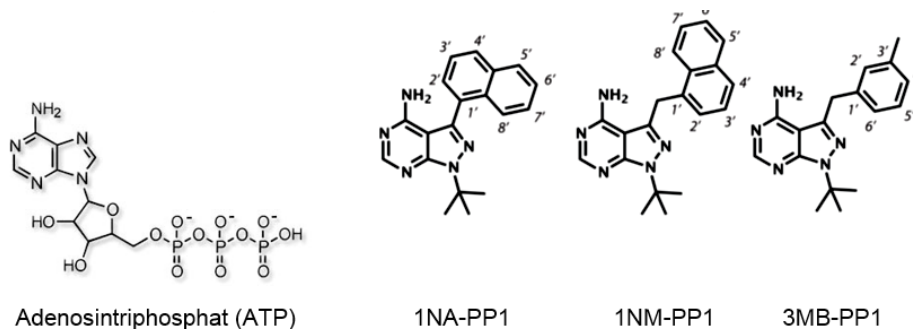


Abbildung 15| Chemische Struktur der Inhibitoren im Vergleich zu ATP

Die C-Atome der an das Pyrazolpyrimidin (PP) angefügten Gruppen sind nummeriert. Na, Naphtyl-; NM, Naphthylmethyl-; 3MB, 3'-Methylbenzyl-; Die Abbildung wurde von Zhang et al (2013) übernommen und modifiziert.

2.2 Die Zugabe des Inhibitors 1NM-PP1 führt zu einem Wachstumsstopp

Da nicht bekannt ist welcher Inhibitor die Prp4_{as2} Kinase inhibiert, wurde untersucht, welchen Einfluss unterschiedliche Konzentrationen der drei Inhibitoren, 1NM-PP1, 1NA-PP1 und 3MB-PP1, in Festmedium auf das Zellwachstum haben.

Dazu wurden Agarplatten mit Minimalmedium (EMM) verwendet. Die Platten wurden ohne Inhibitor, mit 40 µL DMSO (Dimethylsulfoxid) sowie mit 10, 20, 50 und 100 µM des jeweiligen Inhibitors versetzt. Da alle drei Inhibitoren in DMSO gelöst sind, wurde DMSO als Kontrolle eingesetzt, um auszuschließen, dass das Wachstum der Zellen durch DMSO beeinflusst wird.

Es wurden drei Stämme verwendet: der Wildtyp L972, der Kontrollstamm 796 sowie der Stamm 801, der die analog-sensitive Prp4 Kinase exprimiert. Aus einer Hauptkultur wurden die Zellen so verdünnt, dass 10⁴, 10³, 10² und 10 Zellen aufgetropft und 72 Stunden bei 30 °C auf Minimalmedium inkubiert wurden (Abbildung 16).

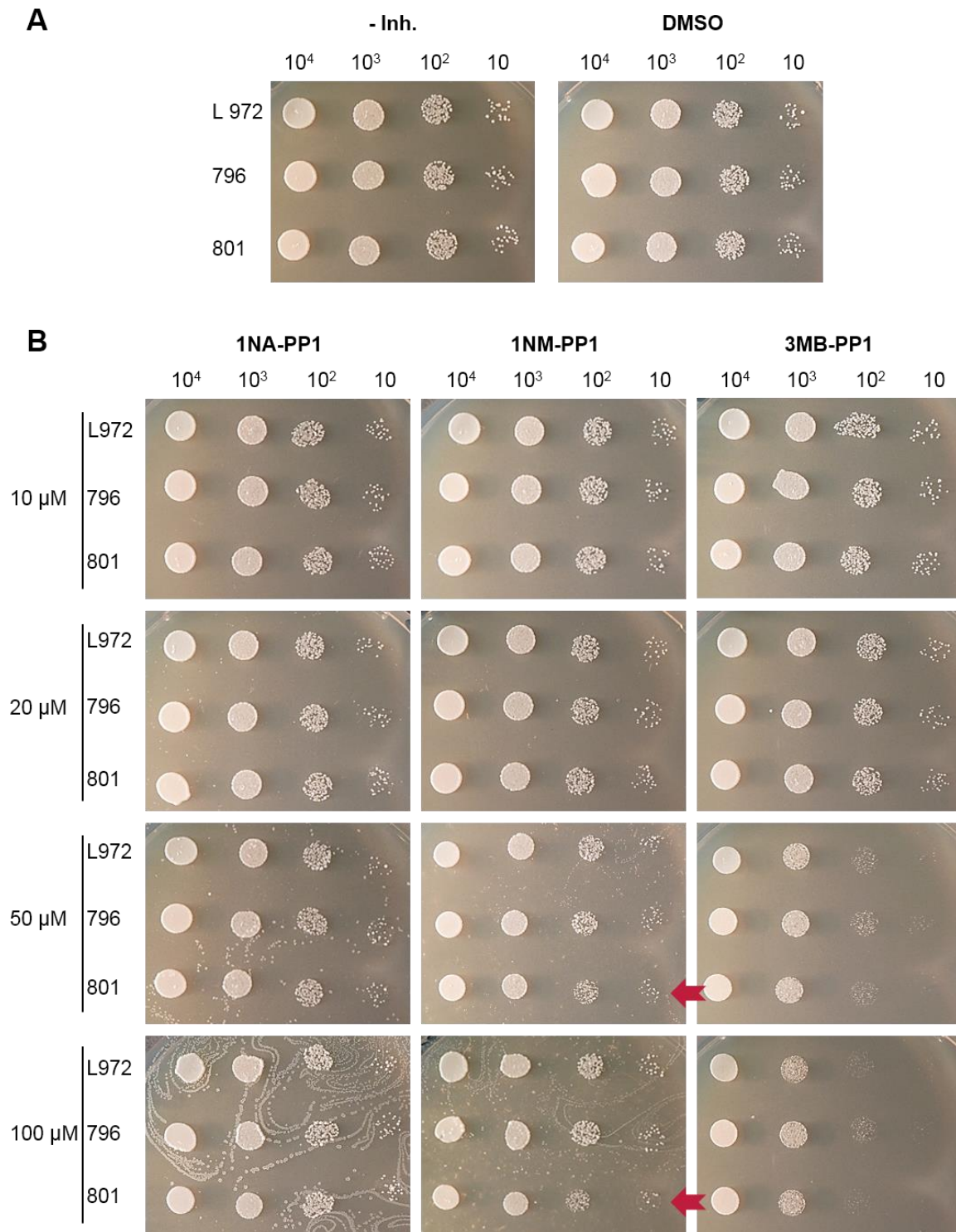


Abbildung 16| Der Inhibitor 1NM-PP1 verlangsamt ausschließlich das Wachstum des Stamms 801

Tropftest der drei Stämme L972, 796 und 801 auf EMM (A) EMM ohne Inhibitorzugabe (-Inh.) und mit DMSO; (B) EMM mit verschiedenen Konzentrationen (10, 20, 50 und 100 μ M, horizontal) der drei Inhibitoren (1NA-PP1, 1NM-PP1 und 3MB-PP1, vertikal). Die Inkubation erfolgte für 72 Std. bei 30 °C. Die roten Pfeile markieren die Kolonien des Stamms 801, die bei einer Konzentration von 50 und 100 μ M 1NM-PP1 kleinere Kolonien ausbilden als die Kontrollstämme.

Wird in Abbildung 16A zunächst das Wachstum der Zellen auf den Minimalmedium Platten ohne Inhibitor miteinander verglichen, zeigt sich, dass der Prp4_{as2} Stamm 801 die gleiche

Wachstumsrate aufweist, wie der Wildtyp- und der Kontrollstamm, was anhand der durchschnittlichen Größe der Kolonien bei den Konzentrationen 10^2 und 10 zu sehen ist. Das deutet darauf hin, dass der Aminosäureaustausch in der ATP-Bindetasche der Kinase nicht zu einem Aktivitätsverlust der Kinase führt. Auch auf der Platte, die DMSO enthält, kann weder ein Unterschied zur Kontrollplatte (- Inh.) noch zwischen den drei Stämmen im Vergleich festgestellt werden. Das heißt DMSO beeinflusst in dieser Konzentration nicht das Wachstum der Zellen auf Festmedium.

Werden alle Platten, die Inhibitor enthalten betrachtet, ist auffällig, dass sowohl der 1NA-PP1 als auch der 1NM-PP1 ab einer Konzentration von 50 μM in Minimalmedium ausfallen und sich als weißliche Schlieren auf der Plattenoberfläche absetzen, während der Inhibitor 3MB-PP1 in Minimalmedium vollständig gelöst bleibt (Abbildung 16B).

Werden nun im Einzelnen die Größe der Kolonien auf den Platten, die unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen enthalten, mit denen der Kontrollplatte ohne Inhibitorzugabe verglichen, zeigt sich, dass der Inhibitor 1NA-PP1 auf keinen der Stämme einen hemmenden Einfluss ausübt. Alle Einzelkolonien bei einer Zellkonzentration von 10^2 und 10 sind in ihrer Größe mit denen der Kontrollplatte vergleichbar (Abbildung 16A und B). Der Inhibitor 1NM-PP1, der sich ebenfalls auf der Plattenoberfläche absetzt, zeigt bei einer Konzentration von 50 und 100 μM einen schwachen Einfluss auf das Zellwachstum des Stamms 801, was an den verkleinerten Einzelkolonien zu beobachten ist. Es ist festzustellen, dass hier ausschließlich das Wachstum des Stamms 801 beeinflusst wird, der die analog-sensitive Kinase exprimiert (Abbildung 16B, rote Pfeile). Im Gegensatz dazu zeigt der dritte getestete Inhibitor 3MB-PP1 ab 50 μM eine starke Inhibition bei allen drei Stämmen, so dass in den Zellkonzentrationen 10^2 und 10 kaum mehr Kolonien zu erkennen sind.

Da der Inhibitor 1NA-PP1 keinen Einfluss auf das Zellwachstum zeigt und der Inhibitor 3MB-PP1 das Wachstum aller drei Stämme inhibiert, wurde in den nachfolgenden Versuchen in Flüssigkultur ausschließlich der Inhibitor 1NM-PP1 in Minimalmedium weiter untersucht.

2.3 Die Konzentration des Inhibitors beeinflusst Dauer und Ausprägung der Inhibition

Um den Einfluss des Inhibitors in Flüssigkultur zu untersuchen, wurden Kulturen der Stämme 801 und 796 in Minimalmedium angesetzt, am nächsten Tag geteilt und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors 1NM-PP1 sowie DMSO als Kontrolle, versetzt. Der Wildtyp-Stamm L972 wurde ohne Zugabe von Inhibitor mitbetrachtet, um beurteilen zu

können, ob die veränderte ATP-Bindetasche der Zellen des Stamms 801, die die analog-sensitive Kinase exprimieren, einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen schon ohne Inhibitorzugabe hat oder ob sich die Zellen in Flüssigkultur wie die Wildtyp-Zellen verhalten (Abbildung 17).

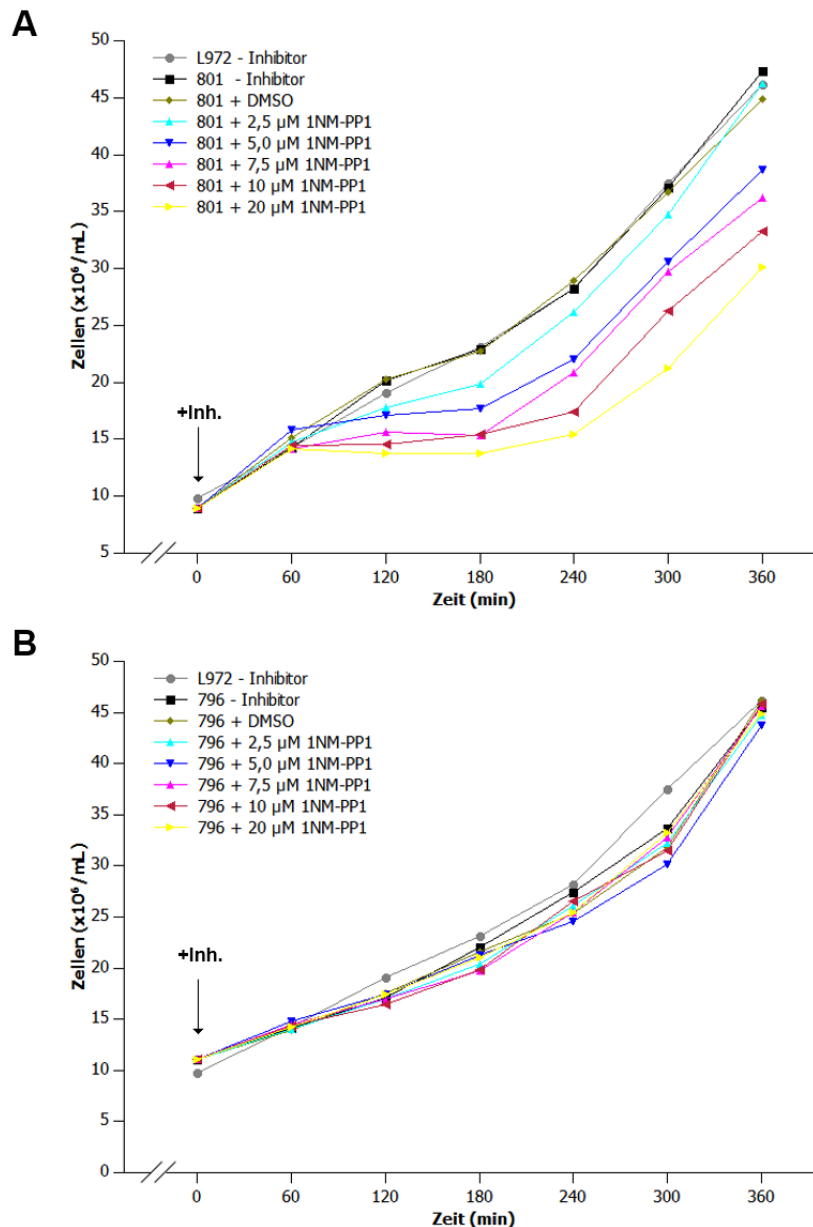


Abbildung 17| Konzentrationsabhängige Inhibition der Zellen in Flüssigkultur

Das Wachstums des Stamms (A) 801 sowie (B) des Kontrollstamms 796 wurde ohne und mit Zugabe verschiedener Konzentrationen des Inhibitors 1NM-PP1 untersucht. Als Kontrolle wurde der Wildtyp L972 ohne Inhibitorzugabe betrachtet. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Inhibitorzugabe (+Inh.).

Werden zuerst die in Abbildung 17A dargestellten Wachstumskurven der Stämme 801 (schwarz) und L972 (grau) ohne Inhibitorzugabe in Flüssigkultur miteinander verglichen, ist zu

erkennen, dass beide die gleiche Wachstumsrate zeigen. Das bedeutet, dass die analog-sensitive Prp4 Kinase nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt ist. Auch die Zugabe von DMSO (oliv) hat in Flüssigkultur keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen.

Bei einer Konzentration des Inhibitors von 2,5 μM (türkis) 1NM-PP1 verringern die Zellen, im Vergleich zu den Zellen ohne Inhibitorzugabe, von 60-180 Minuten nach Zugabe ihr Wachstum. Nach 180 Min. beginnen die Zellen erneut mit dem Wachsen und die Wachstumsrate entspricht der der Zellen ohne Inhibitor. Bei allen untersuchten höheren Inhibitorkonzentrationen von 5-20 μM 1NM-PP1 zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Zellen des Stamms 801 arretieren 60 Min. nach Inhibitorzugabe und stellen dann bis etwa 180 Min. das Wachstum ein. Je höher die Konzentration des Inhibitors ist, desto ausgeprägter und länger arretieren die Zellen. Nachdem die Zellen erneut begonnen haben sich zu teilen, entspricht die Wachstumsrate wieder derjenigen ohne Inhibitorzugabe.

Da unklar ist warum die Zellen nach 180 Min. erneut mit dem Wachsen beginnen, wurde eine Versuchsreihe mit stündlicher Inhibitorzugabe durchgeführt (Abbildung 52, S. 121). Dadurch soll überprüft werden, ob der Inhibitor bei einmaliger Zugabe nach diesem Zeitraum verbraucht ist und ob die Inhibition durch wiederholte Zugaben von Inhibitor verlängert werden kann. Zu den Zellen wurde stündlich 10 μM Inhibitor zugegeben. Das führt dazu, dass die Zellen nur etwa 60 Min. länger arretiert bleiben, als bei einmaliger Zugabe. Das bedeutet, dass es nicht allein der Abbau des Inhibitors sein kann, der zu erneutem Wachstum führt, sondern auch Veränderungen in der Zelle, die durch den Inhibitor beeinflusst werden.

Da die ATP-Bindetasche von Wildtyp Kinasen nicht für ATP analoge Inhibitoren zugänglich sein sollte, darf ausschließlich die mutierte Kinase inhibiert werden. Um das zu überprüfen wurde der Stamm 796, der die Wildtyp Prp4 Kinase besitzt, mit den zuvor verwendeten Konzentrationen des Inhibitors 1NM-PP1 inkubiert und die Wachstumsrate bestimmt (Abbildung 17B). Die Wachstumskurven sind auch hier im Vergleich zum Wildtyp L972 dargestellt und es wird deutlich, dass keine der verwendeten Konzentrationen des Inhibitors das Wachstum der Zellen beeinflusst. Auch bei hohen Konzentrationen wie 10 und 20 μM (rot und gelb) kann kein Wachstumsstopp der Zellen beobachtet werden.

Aus den Versuchsergebnissen dieses Abschnitts hat sich ergeben, dass die Prp4_{as2} Kinase in Minimalmedium mit einer Konzentration von 10 μM 1NM-PP1 über einen längeren Zeitraum gehemmt werden kann, so dass diese Bedingungen in allen weiteren Versuchen beibehalten wurden.

3 Die Inhibition der Prp4 Kinase beeinträchtigt den Zellzyklus und die Spleißeffizienz

Nachdem gezeigt wurde, dass die Inhibition der Prp4_{as2} Kinase zu einem transienten Wachstumsstopp der Zellen führt, stellt sich die Frage, ob die Beeinträchtigung des Spleißprozesses und damit das Fehlen von gespleißten Transkripten die Ursache des Arretierens der Zellen sein kann. Dazu wurden folgende Fragestellungen überprüft: 1) An welchem Punkt im Zellzyklus halten die Zellen an? 2) Welche Auswirkung hat die chemische Inhibition der Kinase auf den Spleißprozess?

3.1 Nach Inhibition der Kinase arretieren die Zellen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus

Um die erste Fragestellung zu bearbeiten, wurden aus drei unabhängigen Experimenten Wachstumskurven ohne und mit Zugabe des Inhibitors bei 30°C in EMM erstellt. Dabei wurde auch der prozentuale Anteil an Septen dieser Kulturen bestimmt (Abbildung 18).

Die Zellen des Stamms 801 stellen, wie bei den vorherigen Inhibitionsversuchen, 60 Min. nach Inhibitorzugabe das Wachstum ein, arretieren bis 180 Min. und beginnen dann erneut mit der Teilung (Abbildung 18A). Wird dazu der prozentuale Anteil an Septen betrachtet (Abbildung 18B) ist zunächst zu erkennen, dass die Anzahl der Septen ohne Inhibition der Kinase über die Zeit nur geringfügig schwankt und im Mittel 6-12,5 % der Zellen ein Septum aufweisen. Wird Inhibitor dazugegeben sinkt die Anzahl der Septen, so dass von 120-180 Min. nur noch maximal 2,5 % der Zellen ein Septum aufweisen. Diese Verringerung der Septenanzahl korreliert mit dem Arretieren des Zellwachstums. Nach 240 Min. steigt die Zahl der Septen wieder an und die mitotische Teilung geht weiter.

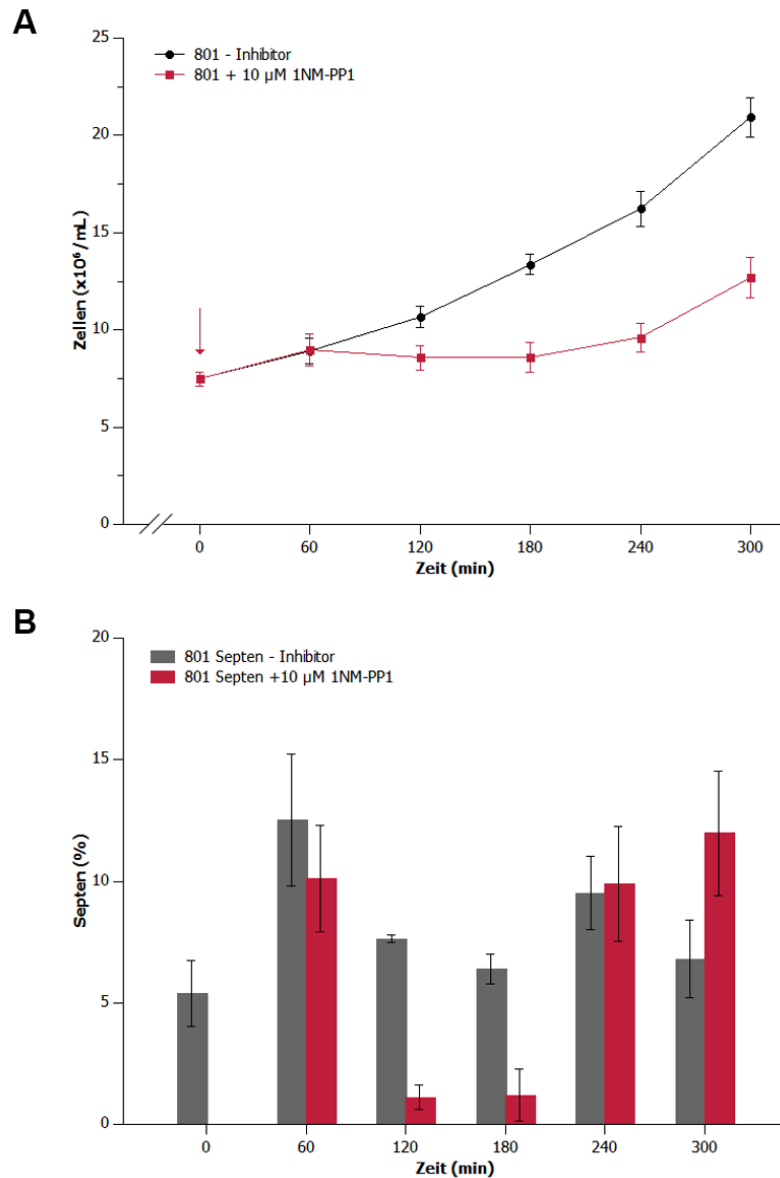


Abbildung 18| Transienter Wachstumsstopp der Zellen korreliert mit Septenbildung

Das (A) Wachstumsverhalten der Zellen ohne (grau) und mit (rot) Inhibitorzugabe wurde der (B) Septenbildung im gleichen Zeitraum gegenübergestellt. Der Zeitpunkt der Zugabe des Inhibitors ist mit einem roten Pfeil markiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Um zu untersuchen in welchem Stadium des Zellzyklus die Zellen der Spalthefe arretieren, wurden diese fluoreszenz-mikroskopisch betrachtet und eine FACS-Analyse (*engl. fluorescence-activated cell sorting*) durchgeführt.

Die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop sind in Abbildung 19 dargestellt, wobei sowohl die Durchlicht- (DIC) als auch die Fluoreszenzbilder im direkten Vergleich gezeigt sind. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindole) angefärbt und Calcofluor white wurde verwendet, um die Septen sichtbar zu machen.

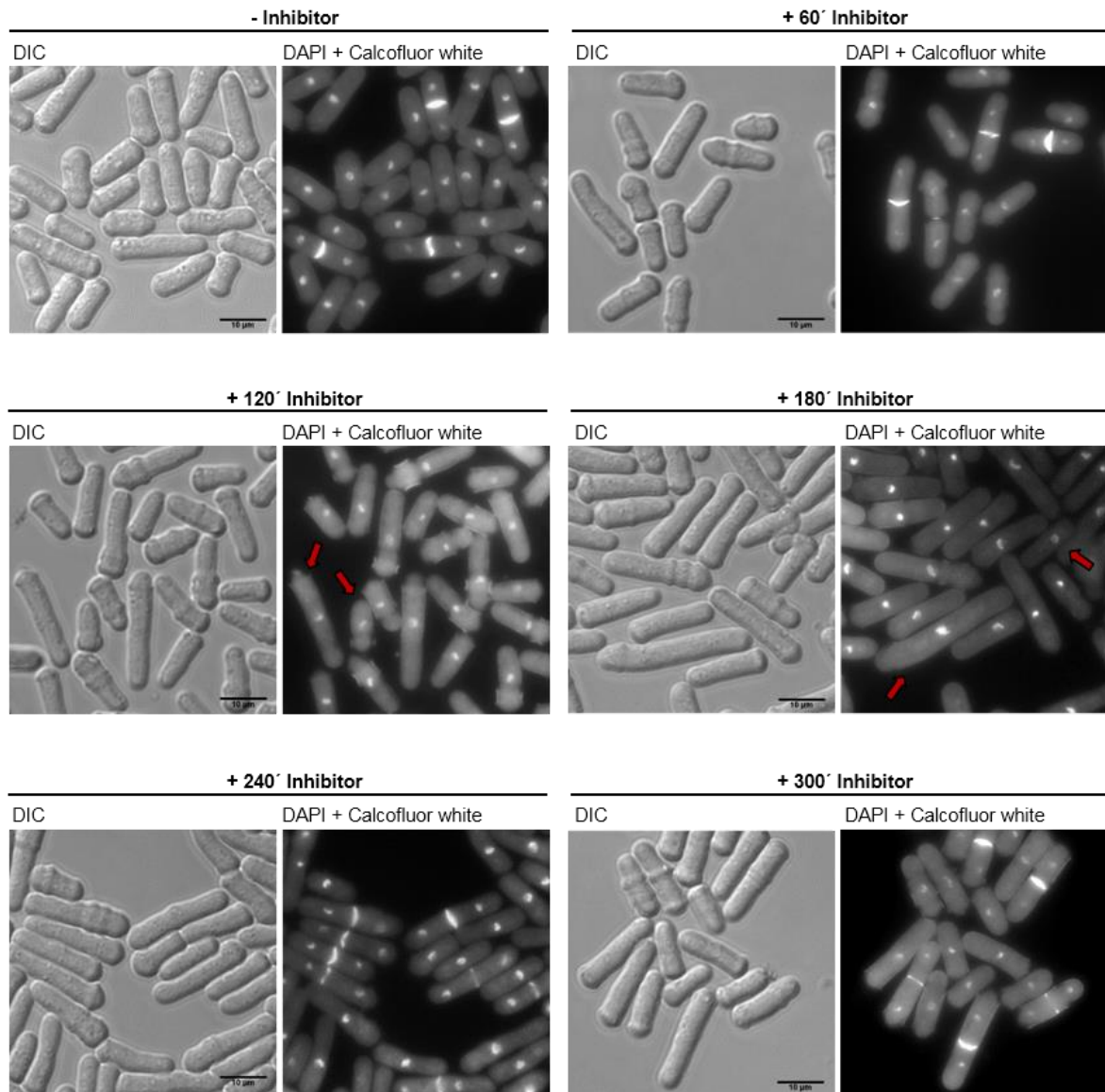


Abbildung 19| Die Inhibition der Kinase führt zu zwei verschiedenen Zellpopulationen

Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der Zellen ohne und mit Zugabe von 10 µM 1NM-PP1. Zeitgleich sind die Zellkerne mit DAPI und die Septen mit Calcofluor white angefärbt. Nach 120 und 180 Min. sind sehr lange und sehr kurze Zellen (rote Pfeile) zu beobachten, die nur einen Zellkern besitzen. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Ohne Inhibition der Kinase zeigt sich deutlich eine heterologe Zellkultur, die jedes Stadium des mitotischen Zellzyklus aufweist. 120-180 Min. nach Inhibition sind dagegen nur noch zwei Populationen von Zellen in der vorher sehr gemischten Kultur zu finden. Diese zwei Populationen bestehen einerseits aus kurzen (~10 µm) und andererseits sehr langen (~20-30 µm) Zellen, wobei zu erwähnen ist, dass weitaus mehr lange als kurze Zellen vorliegen. Beide Populationen besitzen ausschließlich einen Zellkern und nahezu alle zeigen kein Septum mehr. Nach 240 Min. liegen bei den langen Zellen wieder zwei Zellkerne vor und es treten gehäuft Septen auf. 300 Min. nach Inhibitorzugabe liegt erneut eine heterologe Zellkultur vor.

Versucht man die beiden Zellpopulationen, die nach der Inhibition auftreten, anhand der mikroskopischen Aufnahmen Zellzyklusphasen zuzuordnen, scheinen sich die langen Zellen am Ende der G2-Phase zu befinden, bevor sich zwei Zellkerne herausbilden. Die kurzen Zellen dagegen könnten sich sowohl am Übergang der G1- zur S-Phase als auch am Anfang der G2-Phase befinden.

Es wurde nun eine FACS-Analyse durchgeführt (Abbildung 20), um zu untersuchen, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen nach chemischer Inhibition befinden. Schwelnus et al (2001) haben gezeigt, dass bei Zellen, die das temperatursensitive (ts) Allel der Prp4 Kinase oder auch ein ts-Allel des Substrats Prp1 exprimieren, bei der restriktiven Temperatur ein einfacher (1C) und ein doppelter (2C) DNA-Gehalt nachweisbar ist. Das bedeutet, dass die Zellen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus arretieren.

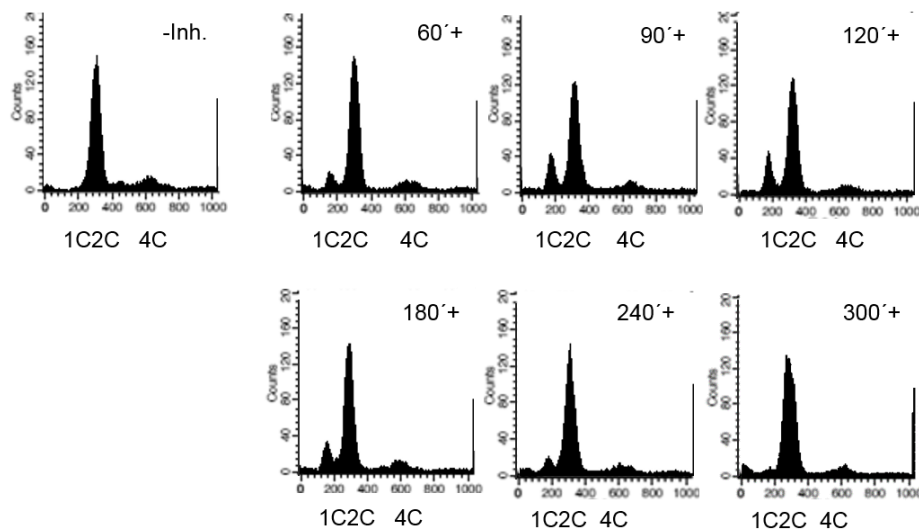


Abbildung 20| Die Zellen zeigen nach Inhibition sowohl einen einfachen als auch einen doppelten DNA-Gehalt

Die FACS-Analyse zeigt, dass nach Zugabe des Inhibitors ein 1C (einfacher DNA-Gehalt) und ein 2C (doppelter DNA-Gehalt) Peak auftritt. Nach 240'+ Inhibitorzugabe verschwindet der 1C Peak langsam wieder.

Jetzt wurden Zellen ohne Inhibitorzugabe, sowie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inhibitorzugabe untersucht (Abbildung 20). Ohne Inhibitorzugabe ist ausschließlich der für *S. pombe* typische 2C Peak zu erkennen. Dieser ergibt sich dadurch, dass während der G2-Phase ein doppelter DNA-Gehalt vorliegt und dies die längste Phase des *S. pombe* Zellzyklus ist, womit sich ein Großteil der Zellen in G2 befindet. Außerdem findet schon eine erneute Replikation der DNA statt, bevor die Teilung der einzelnen Tochterzelle vollständig abgeschlossen ist. Die nach der Teilung entstehenden Tochterzellen befinden sich dadurch

bereits in der G2-Phase und weisen einen doppelten DNA-Gehalt auf (Abbildung 1, S. 4) (Mitchison, 1971).

60 Min. nach Zugabe von 10 μ M 1NM-PP1 entsteht ein 1C Peak, der bis 120 Min. zunimmt und sich danach wieder verkleinert. Das deutet daraufhin, dass ein Teil der Zellen für den Zeitraum von 60-180 Min. nach Zugabe des Inhibitors die Teilung vollzogen haben muss, allerdings noch nicht mit der Replikation der DNA beginnen konnte und damit in der G1-Phase einzuordnen ist. Daraus kann geschlossen werden, dass nach Inhibitorzugabe die Zellen in der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus arretieren und stimmt mit den FACS-Ergebnissen der ts-Allele von Prp4 und Prp1, die zur restriktiven Temperatur geshiftet wurden, überein (Schwelnus et al, 2001).

3.2 Die Inhibition der Prp4 Kinase führt nicht bei allen intronhaltigen Genen zu einer Akkumulation von prä-mRNA

Nachdem geklärt wurde, an welcher Position im Zellzyklus die Zellen arretieren, ist jetzt zu untersuchen, welche Folgen die Inhibition der Kinase für den Spleißprozess hat. Dazu wurde anhand von intronhaltigen Genen die Auswirkung der Inhibition der Kinase auf das prä-mRNA Spleißen untersucht. Dabei wurden sowohl intronhaltige Gene ausgewählt, von deren Proteinprodukt bekannt ist, dass es im Zellzyklus eine Rolle spielt, als auch andere intronhaltige Gene.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde, ohne und mit Inhibition der Kinase, aus dem Stamm 801 RNA isoliert und eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer binden jeweils in den Exonsequenzen vor und nach den untersuchten Introns (Abbildung 21).

Das erste betrachtete Gen, welches ein Intron besitzt, ist *fta4*. Fta4 ist ein Kinetochor-assoziiertes Protein, das während der Meiose und Mitose in den Transport der Schwesterchromatiden involviert ist, die über den Spindelapparat zu den Polen transportiert werden (Liu et al, 2005). Die RT-PCR Untersuchung zeigt, dass ohne Inhibitorzugabe hauptsächlich mRNA mit einer Größe von 276 bp vorliegt. Wird 10 μ M 1NM-PP1 dazugegeben, kehrt sich schon nach 10 Min. das Verhältnis um und es kann hauptsächlich prä-mRNA (350 bp) detektiert werden. Die Inhibition hält bis 60 Min. an und ab 90 Min. kehrt sich das Verhältnis von mRNA zu prä-mRNA erneut um und Spleißen findet wieder statt. Nach 120 Min. wird überwiegend mRNA detektiert und das Verhältnis gleicht langsam wieder dem Ausgangsverhältnis ohne Inhibitorzugabe.

Pyp3, das zweite betrachtete Gen, besitzt ebenfalls nur ein Intron und codiert für eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die zum Zeitpunkt des Übergangs von der G2- in die M-Phase benötigt wird. (Millar et al, 1992). Bei *Pyp3* kann das gleiche Spleiß-Inhibitionsverhalten nach Inhibitorzugabe beobachtet werden, wie schon bei *fta4* (Abbildung 21).

Bei dem nächsten Gen handelt es sich um *thp1*, welches drei Introns besitzt und für das TATA-Bindeprotein codiert (Hoffmann et al, 1990). Wird hier die Spleißeffizienz des dritten Introns nach Inhibition der Kinase untersucht, ergibt sich das gleiche Spleißmuster wie bei den beiden vorherigen Transkripten.

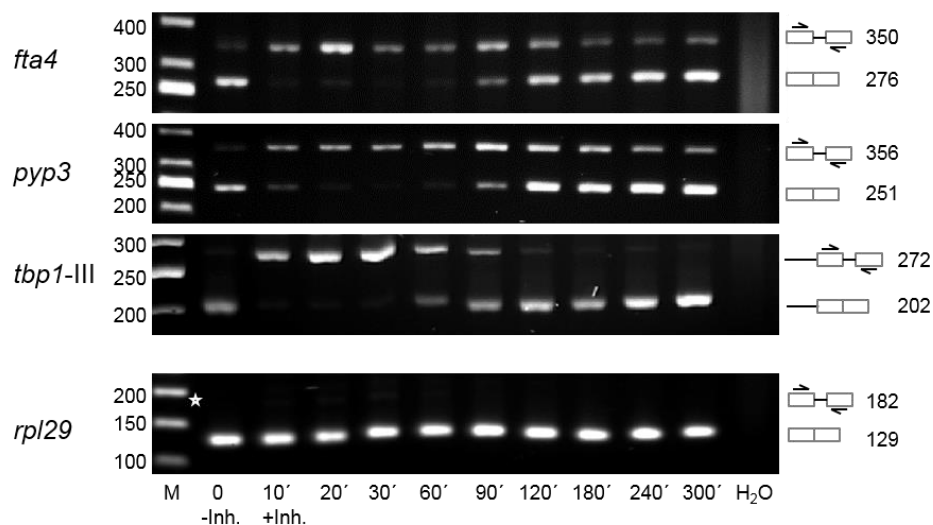


Abbildung 21| Die RT-PCR Analyse von *fta4*, *pyp3* und *thp1-III* zeigt im Gegensatz zu *rpl29* eine Akkumulation von prä-mRNA nach Inhibitorzugabe

Ohne Zugabe von Inhibitor (0, -Inh.) wird bei allen vier Genen hauptsächlich mRNA amplifiziert. Während bei *fta4*, *pyp3* und *thp1-III* von 10' bis 90' nach Zugabe von Inhibitor (+Inh.) überwiegend prä-mRNA detektiert wird, kann bei *rpl29* ausschließlich mRNA amplifiziert werden. *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments; M, Größenstandard; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template. Bei Genen mit mehreren Introns, hier *thp1*, werden die Introns mit römischen Zahlen nummeriert.

Das Gen *rpl29* kodiert für das ribosomale Protein 29 und besitzt ein Intron. Überraschenderweise zeigt sich hier, im Gegensatz zu *fta4*, *pyp3* und *thp1-III*, nach Inhibition der Kinase keine Akkumulation von prä-mRNA. Zu allen untersuchten Zeitpunkten ist ausschließlich mRNA zu detektieren (Abbildung 21).

Die Cdc2 Kinase, die zusammen mit dem Cyclin Cdc13 den Zellzyklus reguliert (Coudreuse & Nurse, 2010) besitzt in ihrem offenen Leseraster vier Introns und wurde ebenfalls mittels RT-PCR untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet. Das erste Primerpaar bindet in Exon1 und 3, so dass die ersten beiden Introns zeitgleich untersucht

werden können. Das zweite Primerpaar bindet in Exon3 und 5, so dass die Introns III und IV betrachtet werden (Abbildung 22). Die RT-PCR Analyse der Introns des *cdc2*-Gens zeigt ein ähnliches Spleißmuster wie *rpl29*. Ohne Inhibitorzugabe ist wie bei allen bisher untersuchten Transkripten ausschließlich mRNA zu finden. Wird die Kinase inhibiert, zeigt sich bei *cdc2*, dass sich die Spleißeffizienz von 10 bis 90 Min. zwar geringfügig verschlechtert und eine kleine Menge prä-mRNA akkumuliert, aber der größte Teil trotz Inhibition weiterhin als mRNA vorliegt. Die vier *cdc2*-Introns, sowie *rpl29* scheinen die Aktivität der Prp4 Kinase nicht zu benötigen, um herausgespleißt zu werden.

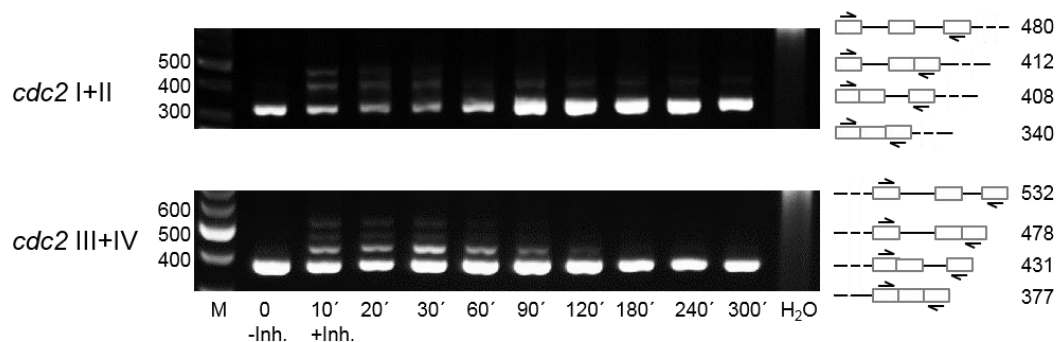


Abbildung 22| Bei vier Introns des *cdc2*-Gens zeigen sich nur geringe Mengen prä-mRNA nach Inhibition

Ohne Zugabe von Inhibitor (0, -Inh.) wird in der RT-PCR hauptsächlich mRNA amplifiziert. Von 10' bis 90' nach Inhibitorzugabe (+Inh.) werden geringe Mengen prä-mRNA detektiert. M, Größenstandard; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template. Bei Genen mit mehreren Introns, hier *cdc2*, werden die Introns mit römischen Zahlen nummeriert.

Die beiden nächsten untersuchten Gene *res1* und *res2* sind Teil des MBF-Komplex (engl. *MluI cell cycle box binding factor*). Der MBF-Komplex fungiert als Transkriptionsfaktor und reguliert in der G1-Phase die Transkription von bis zu 40 Genen, die für die sich anschließende S-Phase benötigt werden. Er setzt sich aus einem Dimer von Cdc10 und jeweils einer Kopie von Res1 und Res2 zusammen (Aligianni et al, 2009; Ayté et al, 1995). *Cdc10* besitzt kein Intron, *res1* und *res2* jeweils eines.

Wird *res1* betrachtet zeigt es den gleichen Inhibitionsverlauf wie *pyp3*, *fta4* und *tbp1*-III. Schon 10 Min. nach Inhibitorzugabe akkumuliert die prä-mRNA und ab 90 Min. beginnt spleißen erneut. Bei *res2* dagegen scheint die Inhibition der Kinase, ähnlich wie bei *cdc2* und *rpl29*, keine Auswirkungen auf die Spleißeffizienz zu haben, denn auch nach Inhibitorzugabe konnte zu allen Zeitpunkten ausschließlich mRNA detektiert werden.

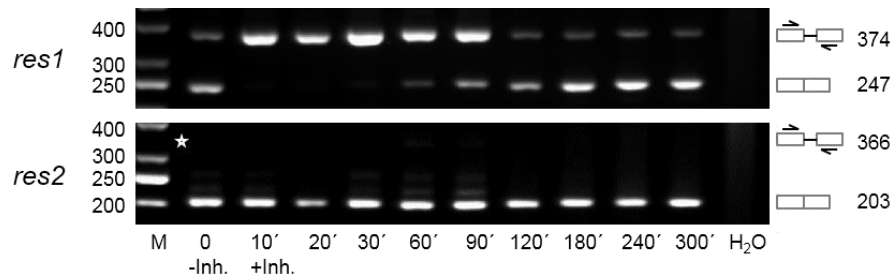


Abbildung 23| Die RT-PCR-Analyse von *res1* und *res2* zeigt eine gegensätzliche Reaktion nach Inhibition der Prp4 Kinase

Ohne Zugabe von Inhibitor (0, -Inh.) wird bei beiden Genen hauptsächlich mRNA amplifiziert. Von 10' bis 90' nach Inhibitorzugabe (+Inh.) wird bei *res1* hauptsächlich prä-mRNA detektiert, während bei *res2* zu allen untersuchten Zeitpunkten ausschließlich mRNA detektiert wird. *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments; M, Größenstandard; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template.

Werden diese Ergebnisse zusammengefasst hat sich schon bei der kleinen Auswahl an hier untersuchten Zellzyklusgenen gezeigt, dass einige dieser Gruppe, nach Inhibition der Kinase, für einen bestimmten Zeitraum nicht mehr effizient gespleißt werden und für 90 Min. hauptsächlich prä-mRNA vorliegt. Dass könnte dazu führen, dass zu bestimmten Zeitpunkten nicht alle benötigten mRNAs und damit auch Proteine zur Verfügung stehen, um den Zellzyklus reibungslos zu durchlaufen, was ein Arretieren der Zellen in G1 und G2 zur Folge haben könnte.

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass es offensichtlich zwei verschiedene Klassen von Introns gibt. Die einen benötigen die Aktivität der Prp4 Kinase um gespleißt zu werden, was dazu führt, dass nach Inhibition der Kinase mehr prä-mRNA vorliegt als mRNA. Gleichzeitig verringert sich die Menge an mRNA und verschwindet bei manchen Genen sogar vollständig. Diese Introns werden im Folgenden Prp4-abhängig gespleißte Introns genannt. Die Anderen zeigen nach Inhibition der Kinase weder eine Verringerung der mRNA Menge noch eine Akkumulation von prä-mRNA und werden zukünftig Prp4-unabhängig gespleißte Introns genannt.

4 Bei 36 °C zeigen Zellen, die das ts-Allel *prp1-127^{ts}* exprimieren, ausschließlich bei Prp4-abhängigen Introns eine Akkumulation von prä-mRNA

Da es sich bei dem Protein Prp1 um ein *in vivo* Substrat der Prp4 Kinase handelt, wurde das temperatursensitive Allel *prp1-127^{ts}* verwendet, um zu untersuchen, wie sich die Introns der vorher betrachteten Gene nach Shift zur restriktiven Temperatur verhalten. Dazu wurden die Zellen bei 25 °C kultiviert und anschließend zu 36 °C geshiftet, RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt (Abbildung 24).

Bei dem *res1*-Intron und dem dritten Intron von *tbp1* wird in der RT-PCR bei 25 °C hauptsächlich mRNA detektiert, während bei 36 °C prä-mRNA akkumuliert und sich die mRNA Menge für 60 Min. verringert und bei *res1* sogar vollständig verschwindet. Die Introns von *res2* und *rpl29* zeigen zu allen untersuchten Zeitpunkten ausschließlich mRNA wodurch deutlich wird, dass das Spleißen dieser Introns nicht beeinträchtigt wird. Bei den Introns III und IV des Gens *cdc2* wird zu allen Zeitpunkten hauptsächlich mRNA amplifiziert. Hier ist nach dem Shift zu 36 °C, genau wie bei der Inhibition der Prp4 Kinase, nur eine geringe Menge an prä-mRNA sichtbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Inhibition der Prp4 Kinase oder des Substrats Prp1 dieselben Introns akkumulieren.

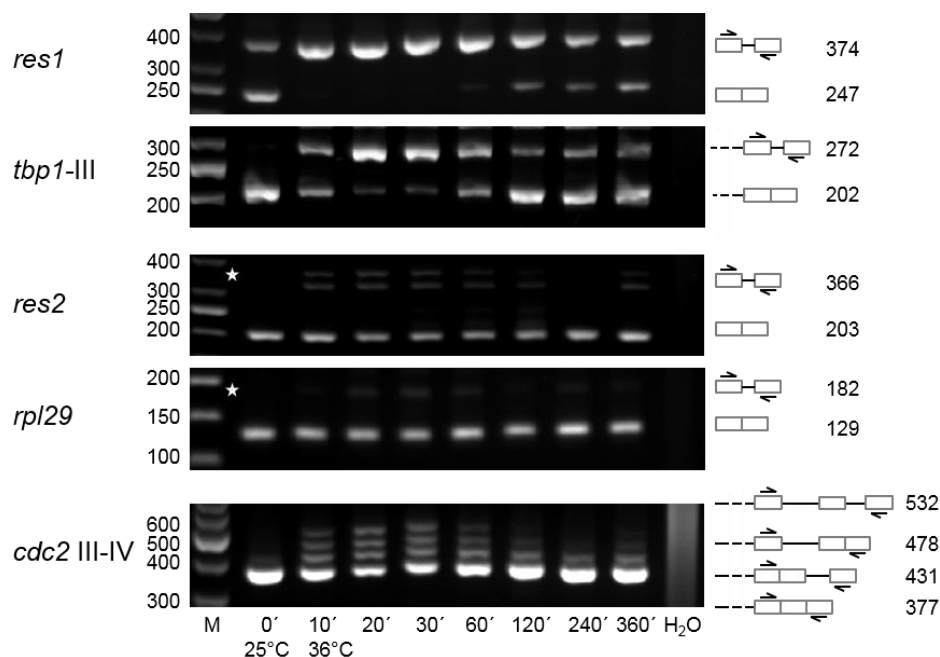


Abbildung 24| Bei 36 °C beeinflusst die Expression von *prp1-127^{ts}* ausschließlich die Prp4-abhängigen Introns

Bei 25 °C wird bei allen Genen hauptsächlich mRNA amplifiziert. Von 10' bis 60' nach Shift zu 36 °C wird bei *res1* und *tbp1*-III hauptsächlich prä-mRNA detektiert, während bei *res2*, *rpl29* und *cdc2* III+IV zu allen untersuchten Zeitpunkten mehr mRNA als prä-mRNA vorliegt. *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments; M, Größenstandard; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template.

5 Die RNA-Sequenzierung bestätigt die Existenz von zwei verschiedenen Intronklassen

Um herauszufinden, welche Introns im Genom der Spaltheefe abhängig von der Prp4 Kinase und welche unabhängig gespleißt werden, wurde nach Inhibition der Kinase eine RNA-Sequenzierung aller Transkripte durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass Introns tatsächlich unterschiedlich auf die Inhibition der Kinase reagieren und in Prp4-abhängige

und -unabhängige gegliedert werden können. Anschließend sollte untersucht werden, ob sich diese beiden Klassen durch bestimmte charakteristische Merkmale wie bestimmte Sequenzmerkmale in Exons und Introns oder Introngröße unterscheiden lassen. Des Weiteren wurde versucht herauszufinden, ob die eine oder die andere Klasse von Introns gehäuft in bestimmten Genfunktionsgruppen (GO) auftritt.

5.1 Die Introns der Spaltheife wurden zwei Klassen zugeordnet

Die RNA-Sequenzierung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. José Ayté an der Universitat Pompeu Fabra (Barcelona) durchgeführt. Es wurde drei verschiedene experimentelle Bedingungen gewählt und miteinander verglichen: ohne Zugabe des Inhibitors, sowie 30 und 60 Min. nach Zugabe von 10 μ M 1NM-PP1.

Bei der bioinformatischen Auswertung wurde der *Relative Splicing Efficiency Index* (RSEI) der einzelnen Introns bestimmt, um eine Einordnung in die beiden vorher genannten Klassen zu ermöglichen. Der RSEI-Wert wurde für die einzelnen experimentellen Bedingungen folgendermaßen berechnet:

$$\text{RSEI} = \log_2 \frac{(\text{Anzahl gespleißte Transkripte} + 1)}{(\text{Anzahl ungespleißte Transkripte} + 1)}$$

Die Introns, bei denen nach Inhibition mehr mRNA als prä-mRNA gefunden wurde, besitzen einen positiven RSEI-Wert und gehören zur Klasse der Prp4-unabhängigen Introns. Im Gegensatz dazu weisen die Prp4-abhängig gespleißten Introns mehr prä-mRNA als mRNA auf, was zu einem negativen RSEI-Wert führt.

Werden die Ergebnisse im Detail betrachtet zeigt sich, dass von 5300 Introns in proteinkodierenden Genen in *S. pombe* (Wood et al, 2012), die in diesem Projekt ermittelten Sequenzen eindeutig 3565 Introns in 2301 Genen zugeordnet werden konnten. Für diese Introns wurden zu jedem untersuchten Zeitpunkt zehn oder mehr Sequenzen ermittelt, so dass sowohl ohne als auch mit Inhibitorzugabe ein RSEI-Wert bestimmt werden konnte.

In Abbildung 25 ist ein Häufigkeitshistogramm dargestellt, in dem die Anzahl der Introns dem jeweiligen RSEI-Wert ohne, sowie 30 und 60 Min. nach Inhibitorzugabe zugeordnet wurde. Ohne Inhibitorzugabe liegt für alle untersuchten Introns ein positiver RSEI-Wert vor. Bei 30 und 60 Min. nach Inhibition zeigen 71,7 % der Introns weiterhin mehr mRNA als prä-mRNA und besitzen damit einen positiven RSEI-Wert. Diese Introns bilden die Klasse der Prp4-unabhängigen Introns. Dagegen zeigen 28,3 % der Introns nach Inhibitorzugabe einen

negativen RSEI, da zu diesem Zeitpunkt mehr prä-mRNA als mRNA gefunden wurde. Diese Introns bilden die Klasse der Prp4-abhängigen Introns.

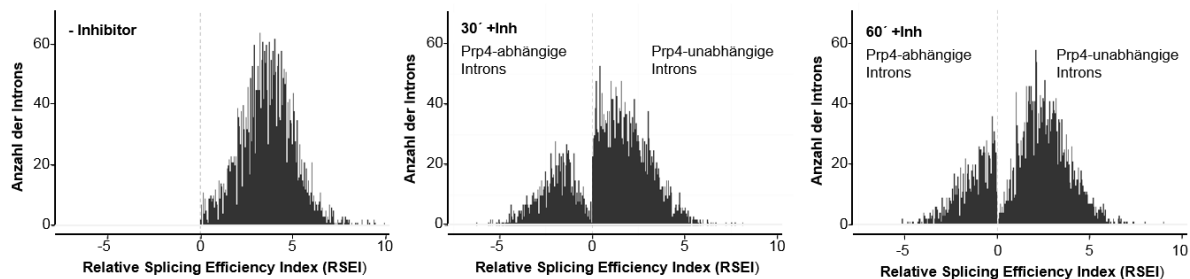


Abbildung 25| Das Häufigkeitshistogramm zeigt nach Inhibition der Kinase zwei verschiedene Klassen von Introns

Die Anzahl der Introns wurde dem jeweiligen Relative Splicing Efficiency Index (RSEI)-Wert zugeordnet, wodurch 30 und 60 Min. nach Inhibition (+Inh) zwei Intronklassen entstehen. Die Prp4-unabhängigen zeigen einen positiven RSEI, während die Prp4-abhängigen Introns einen negativen RSEI-Wert aufweisen.

5.2 Die Abhängigkeit von der Aktivität der Prp4 Kinase ist intronspezifisch

Werden Gene, die mehrere Introns enthalten, betrachtet ist zu erkennen, dass die Prp4-Abhängigkeit intronspezifisch und nicht genspezifisch ist. Es gibt Gene, bei denen alle Introns entweder abhängig oder unabhängig gespleißt werden, aber es gibt auch Gene bei denen einige Prp4-abhängig und andere Prp4-unabhängig gespleißt werden (Abbildung 26).

In der Abbildung 26A sind als Beispiel die RT-PCRs sowie die zugehörigen RSEI-Werte der Gene *rpb5* und *ade2* gezeigt. Beide Gene besitzen je zwei Prp4-unabhängig gespleißte Introns, jeweils ein Kleines von 64 bp bzw. 39 bp sowie je ein Großes von 211 bp bzw. 383 bp. Es wurden Primer verwendet, die in den angrenzenden Exons binden, um die Introns jeweils einzeln in der RT-PCR zu untersuchen. Wird zuerst das Agarosegel für *rpb5* betrachtet zeigt sich bei beiden Introns, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten, mit und ohne Inhibition, die gleiche Menge an mRNA zu detektieren ist. Bei dem kleinen Intron I von *rpb5* kann nach Inhibition keine prä-mRNA detektiert werden. Bei dem Intron II ist nur ein Hauch von prä-mRNA nach Inhibition zu erkennen, während der größte Teil gespleißt vorliegt. Bei dem kleinen Intron von *ade2* findet sich zu allen Zeitpunkten eine geringe Menge an prä-mRNA, während der größte Teil gespleißt wird und auch nach Inhibition tritt keine Verringerung der mRNA auf. Das große Intron von *ade2* zeigt ohne und mit Inhibition ausschließlich mRNA.

Das Gen *tbp1*, besitzt drei Introns, die alle einen negativen RSEI-Wert aufweisen und damit Prp4-abhängig gespleißt werden. Bei der RT-PCR zeigt sich, dass alle drei Introns ohne Inhibition der Kinase effizient gespleißt werden. 10 und 30 Min. nach Inhibitorzugabe verringert sich die mRNA Menge und hauptsächlich prä-mRNA liegt vor (Abbildung 26B).

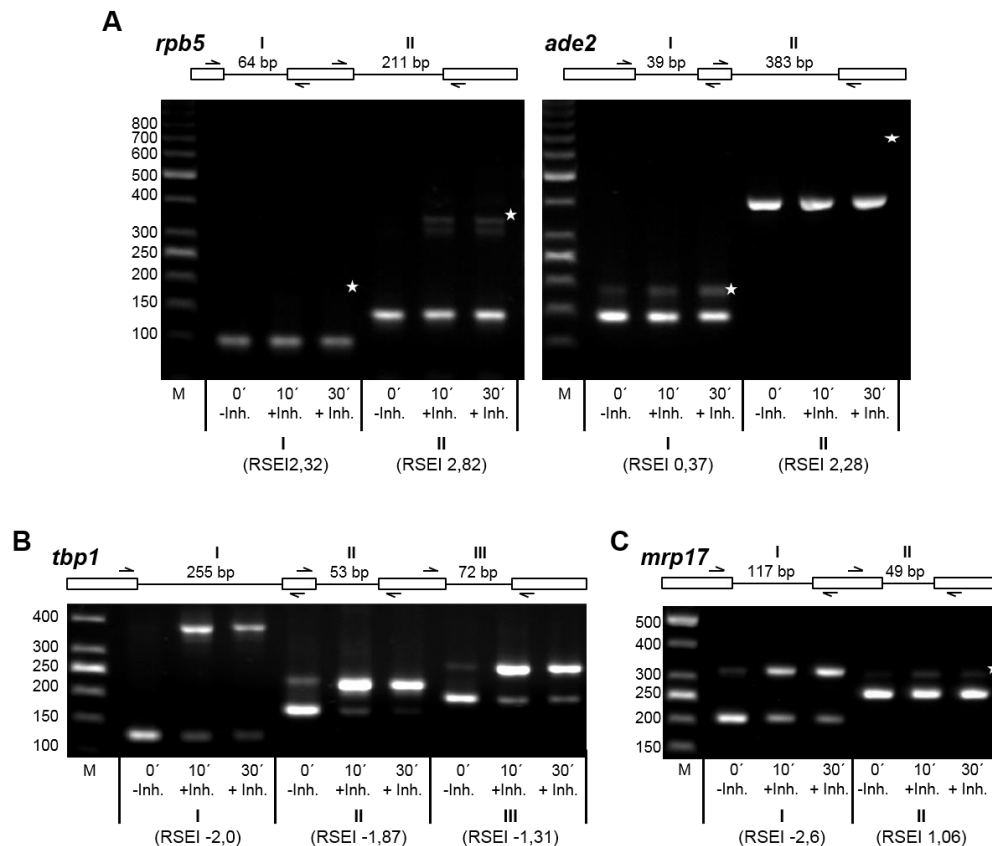


Abbildung 26| Bei Genen, die mehrere Introns enthalten, können alle Kombinationen von Prp4-abhängigen und -unabhängigen Introns auftreten

(A) Die RT-PCR Analyse der Introns von *rpb5* und *ade2* zeigt zu den untersuchten Zeitpunkten, ohne, 10' und 30' nach Inhibition, hauptsächlich mRNA. (B) Die Introns von *tbp1* zeigen ohne Inhibition (-Inh.) hauptsächlich mRNA. Nach Inhibition (10' und 30', + Inh.) kann hauptsächlich prä-mRNA detektiert werden. (C) Die Introns von *mrp17* zeigen ohne Inhibition (-Inh.) hauptsächlich mRNA. Nach Inhibition (10' und 30', + Inh.) kann vom ersten Intron hauptsächlich prä-mRNA detektiert werden, während das zweite Intron weiterhin gespleißt wird. Alle Gene sind oberhalb der Agarosegel Bilder schematisch dargestellt und die verwendeten Primer, sowie Introngrößen eingezeichnet. Unterhalb sind die RSEI-Werte der einzelnen Introns angegeben. Die Introns sind in 5'-3' Richtung mit römischen Zahlen nummeriert. Links befinden sich die Fragmentgrößen des Standards. *, erwartete Größe der prä-mRNA; M, Marker

Wie zuvor schon erwähnt sind nicht alle Introns eines Gens immer abhängig oder unabhängig von der Kinase, sondern es gibt auch Gene, bei denen sich die Introns unterschiedlich verhalten. Ein solches Gen ist *mrp17* (Abbildung 26C). Es besitzt zwei Introns, wovon das erste Prp4-abhängig und das zweite Prp4-unabhängig gespleißt wird. Bei Betrachtung der RT-PCR ist deutlich die Abnahme der mRNA sowie die Akkumulation von prä-mRNA bei Intron I zu erkennen. Bei Intron II bleibt die mRNA Menge konstant und es kann nach Inhibition nur ein Hauch von prä-mRNA gefunden werden.

Zusammen mit den Daten der RNA-Sequenzierung zeigen diese Ergebnisse, dass es intronspezifisch und nicht genspezifisch ist, ob ein Intron die Kinase benötigt um gespleißt zu werden oder nicht. Da bei den mit RT-PCR betrachteten Introns sowohl kleine als auch für *S. pombe* schon große Introns dabei waren, scheint die Größe keinen Einfluss darauf zu haben, zu welcher Klasse ein Intron gehört. Trotzdem wurden die Introngrößen der beiden Klassen getrennt betrachtet (Abbildung 27). Dabei ist zu erkennen, dass es keine Unterschiede in den beiden Intronklassen bezüglich der Größe der Introns gibt.

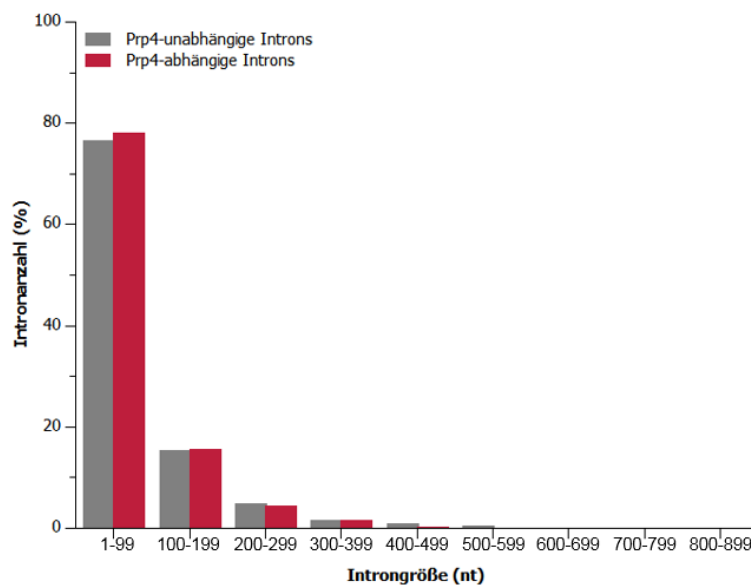


Abbildung 27| Die beiden Intronklassen unterscheiden sich im Durchschnitt nicht in der Größe der Introns

Die Introns sind nach Größen (nt) zusammengefasst und der Prozentanteil an der jeweiligen zugehörigen Intronklasse bestimmt. Jeder Balken umfasst einen Bereich von 99 nt. (grau) Prp4-unabhängig gespleißte Introns; (rot) Prp4-abhängig gespleißte Introns

Auch bei einer Zuordnung nach dem GO-System, bei dem die Gene nach ihrer Funktion bestimmten Gruppen zugeordnet werden, wie Zellzyklus, Transport, Signaltransduktion usw., zeigt sich keine Anhäufung einer Gengruppe in einer der beiden Intronklassen.

Werden die Intronsequenzen sowie die angrenzenden Exonsequenzen verglichen sind bei beiden Klassen, zusätzlich zu den konservierten Spleißstellen, keine weiteren spezifischen Sequenzmerkmale zu erkennen, die eine Zugehörigkeit zu der einen oder der anderen Klasse erklären könnte. Werden die Konsensussequenzen der Spleißstellen beider Klassen gegenübergestellt, können nur geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Intronklassen festgestellt werden (Abbildung 28).

Betrachtet man die Größe der dargestellten Basen in den WebLogo-Sequenzen, die die Häufigkeit dieser Base an der Position repräsentiert, scheint, dass an Position -1 im Exon1 bei den Prp4-unabhängig gespleißten Introns häufiger ein Guanin zu finden ist, als bei den Prp4-abhängigen Introns. Und auch die Basen an den Positionen +5 (Guanin) und +6 (Uracil) im Intron sind bei den Prp4-unabhängigen Introns häufiger komplementär zur U1 snRNA, was die Bindung stabilisieren könnte. Wird in % das Auftreten der einzelnen Basen an der jeweiligen Position bei Prp4-unabhängigen und -abhängigen Introns verglichen, zeigen die Positionen -1, +5 und +6 jeweils in mehr als 10% der Introns häufiger eine Komplementarität zur U1 snRNA bei den Prp4-unabhängigen Introns (Tabelle 21, S. 121 und Tabelle 22, S. 122). An allen anderen Positionen sind die Unterschiede zwischen den beiden Intronklassen geringer.

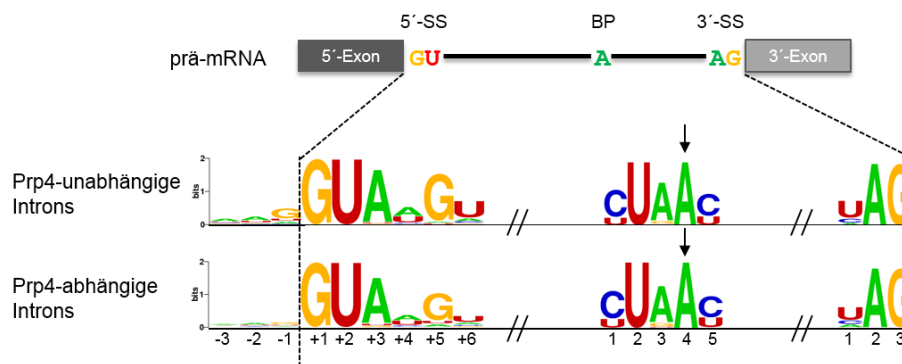


Abbildung 28| Es bestehen nur geringfügige Unterschiede in den Konsensussequenzen beim Vergleich beider Intronklassen

Schematische Darstellung einer prä-mRNA der Spaltheife. Die Konsensussequenz der 5'-SS, die BS und die 3'-SS sind dargestellt. Es gibt nur geringfügige Sequenzunterschiede zwischen Prp4-unabhängigen und -abhängigen Introns. Pfeil, markiert den BP. Die Sequenzlogos wurden mit dem Programm WebLogo generiert (Crooks et al, 2004). 5'-SS, 5'-Spleißstelle; BP, Verzweigungspunkt; 3'-SS, 3'-Spleißstelle

6 Die Information, ob ein Intron Prp4-abhängig oder -unabhängig gespleißt wird, liegt im Intron und den angrenzenden Nukleotiden

Da auch in den Sequenzen nur geringfügige Unterschiede festzustellen sind, wird zunächst untersucht, ob ein Intron Prp4-abhängig bzw. -unabhängig bleibt, wenn es in einen anderen Locus integriert wird. Dazu wurden in das ursprünglich intronlose Gen *ura4* die Sequenzen von zwei verschiedenen Introns eingefügt. Zum einen wurde das Prp4-abhängig gespleißte Intron des *res1*-Gens als auch das Prp4-unabhängige große Intron des *ade2*-Gens (Abbildung 26) über die *StuI* Schnittstelle (AGG[^]CTT) in das *ura4*-Gen kloniert. Beide Konstrukte wurden über homologe Rekombination in den Wildtyp *ura4*-Locus integriert (Abbildung 29).

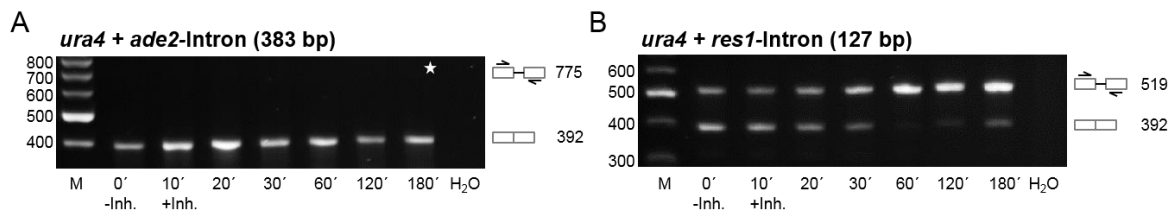


Abbildung 29| Die Integration von Introns in den *ura4*-Lokus verändert nicht den Einfluß der Prp4 Kinase

Das Intron des *ade2*-Gens (A) und das Intron des *res1*-Gens (B) wurden in den *ura4*-Lokus integriert und die Spleißeffizienz ohne (-Inh.) und mit Inhibitorzugabe (+Inh.) mittels RT-PCR untersucht. *, markiert die Position des zu erwartenden prä-mRNA Fragments; M, Größenstandard; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA, mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template.

Bei Betrachtung des *ura4* + *ade2*-Intron-Konstrukts (Abbildung 29A) zeigt sich, dass zu jedem untersuchten Zeitpunkt ausschließlich mRNA in konstanter Menge vorliegt und keine prä-mRNA akkumuliert. Dieses Spleißverhalten nach Inhibition der Kinase entspricht dem des *ade2*-Introns im Wildtyp *ade2*-Lokus (Abbildung 26A). Das heißt das Prp4-unabhängig gespleißte *ade2*-Intron bleibt auch in dem ursprünglich intronlosen Gen *ura4* ein unabhängig gespleißtes Intron.

Das *ura4* + *res1*-Intron-Konstrukt zeigt, dass dieses Transkript schon ohne Inhibition der Kinase nicht vollständig gespleißt vorliegt (Abbildung 29B). Wird Inhibitor dazu gegeben, kommt es zu einer Akkumulation von prä-mRNA und einem Verschwinden der mRNA. Das zeigt, dass das Spleißen des *res1* Introns auch im *ura4*-Lokus die Aktivität der Kinase benötigt. Was sich allerdings vom *res1* Wildtyp lokus unterscheidet ist, dass die Akkumulation erst nach 30 Min. deutlich sichtbar wird und bis 180 Min. anhält, während sie beim *res1* im Wildtyp Lokus schon nach 10 Min. beginnt und bei 120 Min. der größte Teil wieder vollständig gespleißt vorliegt (Abbildung 23).

7 Prp4-abhängige und -unabhängige Introns können durch Mutationen in der Exon1/5'-SS ineinander umgewandelt werden

In den vorherigen Kapiteln hat sich herausgestellt, dass zumindest ein Teil der Information, ob ein Intron die Aktivität der Prp4 Kinase benötigt, um gespleißt zu werden oder nicht, in der Sequenz des Introns und/oder in den direkt angrenzenden Exonsequenzen codiert ist. Auch wenn es bei den Konsensussequenzen der Spleißstellen nur geringe Unterschiede zwischen beiden Klassen gibt, stellt sich die Frage, ob die Aktivität der Kinase bei der Intronerkennung

eine Rolle spielt und dabei die Bindung der snRNPs an Spleißstellen verbessert, die von der Konsensussequenz abweichen.

Beim Erkennen eines Introns durch das Spleißosom haben die RNA-RNA-Interaktionen eine große Bedeutung. Sowohl der U1 snRNP als auch der U2 snRNP interagieren über ihre snRNAs mit der prä-mRNA. Die Komplementarität der U1 snRNA zum Exon1-Intron-Übergang und die Komplementarität der U2 snRNA zur BS des Introns beeinflussen die Bindung der spleißosomalen Partikel (Parker et al, 1987; Séraphin et al, 1988; Siliciano & Guthrie, 1988; Wu & Manley, 1989; Zhuang & Weiner, 1986). Aus diesem Grund wurden zwei Reportergene konstruiert, die ein Prp4-abhängig oder ein Prp4-unabhängig gespleißtes Intron enthalten. Bei diesen beiden Reportergenen wurde sowohl die 5'-SS und die letzten drei Basen des Exon1 als auch die BS durch Mutagenese verändert. Dabei soll untersucht werden, ob eine Erhöhung der Komplementarität der jeweiligen RNAs zueinander zu einem Prp4-unabhängigen Spleißereignis führen kann. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine Verringerung der Komplementarität die Abhängigkeit von der Prp4 Kinase beibehält oder sogar dazu führt, dass ein Intron nicht mehr gespleißt wird.

Als Prp4-abhängiger Reporter wurde das essentielle *res1*-Gen verwendet und als Prp4-unabhängiger Reporter das nicht essentielle Gen *ppk8*. Beide Gene besitzen nur ein Intron, welche eine ähnliche Größe von 127 bp bei *res1* und 117 bp bei *ppk8* aufweisen.

Da es sich bei *res1* um ein essentielles Gen handelt, dass bei einem Verlust seiner Spleißeffizienz, verursacht durch gesetzte Mutationen, zum Tod der Zellen führen könnte, wurde eine zweite Kopie dieses Gens, *res1'*, in den *leu1*-Lokus integriert. Das gleiche Prinzip wurde bei *ppk8* angewendet, auch wenn es sich dabei nicht um ein essentielles Gen handelt.

7.1 Konstruktion des Reportergens *res1'*

Das Gen *res1* wurde durch gerichtete Mutagenese verändert und anschließend über *Bam*HI und *Sal*I in den pML81HA Vektor kloniert (IV3.3, S.85). Der Vektor pML81HA ist ein Integrationsvektor der Spaltheife, der nachdem er mit *Bsi*WI linearisiert wurde, über homologe Rekombination in den *leu1*-Lokus des Leucin auxotrophen Hefestamms 812 integriert wurde. Um einen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zelle auszuschließen, wurde bei der Klonierung des *res1'*-Gens eine Leserasterverschiebung eingefügt. Das führt dazu, dass nach der Transkription kein funktionsfähiges Res1'-Protein gebildet werden kann, da schon nach wenigen Nukleotiden ein neues Stopp-Codon entsteht. Um die Transkription des integrierten Gens zu ermöglichen, besitzt der Vektor den konstitutiven *nmt1*-8 Promotor und ebenso die

nmt1 Terminationssequenz. Abschließend liegen in der Zelle zwei Kopien des *resI*-Gens vor, *resI*⁺ im Wildtyp *resI*-Lokus und *resI*['] im *leuI*-Lokus (Abbildung 30).

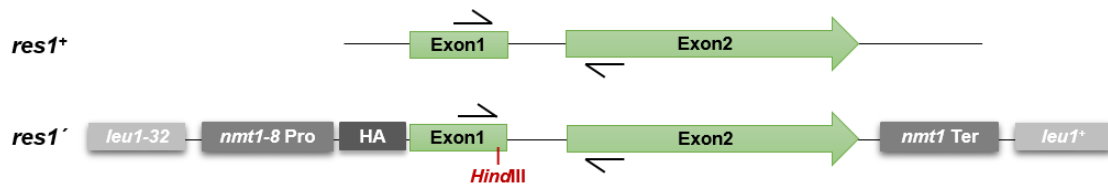


Abbildung 30| Die Allele *resI*⁺ und *resI*['] liegen beide in der Zelle vor

Schematische Darstellung der Gene *resI*⁺ und *resI*['] im Vergleich. Die Position der für die RT-PCR verwendeten Primer ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die *HindIII* Schnittstelle wird für die Unterscheidung zwischen beiden Transkripten während der RT-PCR benötigt.

Zur Untersuchung der Spleißeffizienz wurde zu verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert und im Anschluss eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die Primer so gewählt, dass ausschließlich die Spleißeffizienz des Wildtyp- oder des Reportergens betrachtet wird (IV3.3.2, S. 85).

7.2 *resI*[']-ein Reportergen mit einem Prp4-abhängigen Intron

Wird die 5'-SS des *resI*⁺ Introns betrachtet, ist in Abbildung 31 zu erkennen, dass innerhalb des Introns vier komplementäre Basen zur U1 snRNA vorliegen.

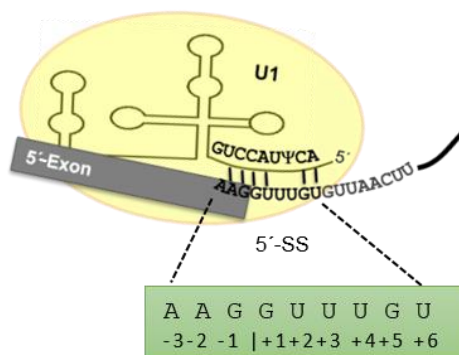


Abbildung 31| Interaktion der U1 snRNA mit der 5'-SS des *resI*⁺ Transkripts

Schematische Darstellung der Interaktion der U1 snRNA mit der 5'-SS und dem Exon1. In grün unterlegt ist ein vergrößerter Ausschnitt der 5'-SS, sowie die letzten 3 Basen des Exon1. Dabei angegeben ist die zukünftig verwendete Nummerierung der einzelnen Basen.

Dazu gehören die konservierten Basen Guanin und Uracil an Position +1 und +2 sowie die Basen an Position +5 und +6. Auch hier befinden sich ein Guanin und ein Uracil. Die beiden Basen in der Mitte der 5'-SS von *resI*, +3 und +4, beide ein Uracil, können keine Paarung mit

der snRNA eingehen. Gegenüber der Base an Position +4 der 5'-SS befindet sich in der *S. pombe* U1 snRNA ein Pseudouridin, was eine starke Bindung mit Adenin und Guanin eingehen kann (Kierzek et al, 2014).

Die Interaktion mit der U1 snRNA geht in das Exon1 über. Aus diesem Grund wurden die letzten drei Basen des Exon1 mitbetrachtet. Dort kann es bei *resI*⁺ zu zwei Basenpaarungen an Position -1 und -2 kommen. Somit weist *resI*⁺ sechs von neun möglichen komplementären Basenpaarungen auf, die ohne Inhibition der Prp4 Kinase ausreichen, um das Intron herauszuspleißen (Abbildung 23, S. 35).

7.2.1 *resI*⁺ zeigt auch im *leuI*-Lokus ein Prp4-abhängiges Spleißverhalten

Damit *resI*⁺ als Reportergen verwendet werden kann, sollte zunächst überprüft werden, ob *resI*⁺ im *leuI*-Lokus weiterhin Prp4-abhängig gespleißt wird. Dazu wurde ein Kontrollstamm konstruiert, der zwar das zusätzliche *resI*⁺-Gen im *leuI*-Lokus besitzt, aber keine weiteren Mutationen in den Spleißstellen aufweist. Dieser Stamm trägt die Stammnummer 991 und wird zukünftig als *resI*⁺-WT bezeichnet.

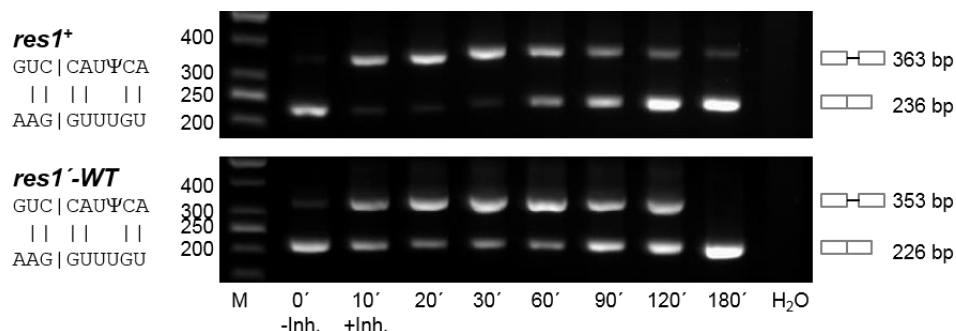


Abbildung 32| Die Transkripte *resI*⁺ und *resI*⁺-WT zeigen ähnliche Spleiß-Inhibitionsmuster

Beide Transkripte, *resI*⁺ und *resI*⁺-WT, zeigen ohne Inhibitorzugabe (-Inh.) hauptsächlich mRNA, während 10 Min. nach Inhibition (+Inh.) bei beiden prä-mRNA akkumuliert.; M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; |, Watson-Crick Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin

Die Spleiß-Inhibitionsmuster von *resI*⁺ und *resI*⁺-WT sind im Vergleich in Abbildung 32 dargestellt. Der zuerst gezeigte Stamm 812 besitzt ausschließlich das Wildtyp *resI*⁺ im Wildtyp-Lokus. Ohne Inhibition der Kinase wird das *resI*⁺ Transkript mit hoher Effizienz gespleißt. 10 Min. nach Inhibitorzugabe kommt es zu einer Akkumulation von prä-mRNA und einem Verschwinden der mRNA. Nach 60-90 Min. wird erneut gespleißt und es ist wieder vermehrt mRNA zu detektieren. Der Stamm 991 ist der Kontrollstamm, der sowohl das *resI*⁺ im Wildtyp-Lokus, als auch ein zusätzliches *resI*⁺-WT im *leuI*-Lokus besitzt. Die hier

verwendeten Primer detektieren ausschließlich das *resI*^{-WT} im *leuI*-Lokus. Ohne Inhibition der Kinase ist, bis auf eine geringe Menge prä-mRNA, hauptsächlich mRNA zu finden. Wird die Kinase inhibiert, kommt es auch bei dem Reportergen nach 10 Min. zu einer Akkumulation von prä-mRNA, die sich nach 90 Min. wieder umkehrt.

Im Unterschied zum *resI*⁺ im Wildtyp-Lokus ist hier zu erkennen, dass die mRNA nie ganz verschwindet. Dazu muss angemerkt werden, dass sich das zusätzlich integrierte *resI*^{-WT} unter dem *nmt1-8* Promotor befindet, der zu einer veränderten Menge an Transkript führt (IV3.3.1, S. 85). Obwohl sich das Gen *resI*⁻ in einem anderen Lokus, mit einem anderen Promotor und Terminator befindet, zeigt es weiterhin ein Prp4-abhängiges Spleißverhalten und kann als Reportergen verwendet werden.

7.2.2 Das Intron wird nicht mehr erkannt, wenn an Position +1 oder +2 der 5'-SS keine Basenpaarung mit der U1 snRNA möglich ist

Es ist bekannt, dass ein GU am Intronanfang benötigt wird, damit ein Intron überhaupt gespleißt wird (Lewin, 1980). Deswegen wurden als Kontrolle zuerst die Basen an Position +1 und +2 mutiert (Abbildung 33).

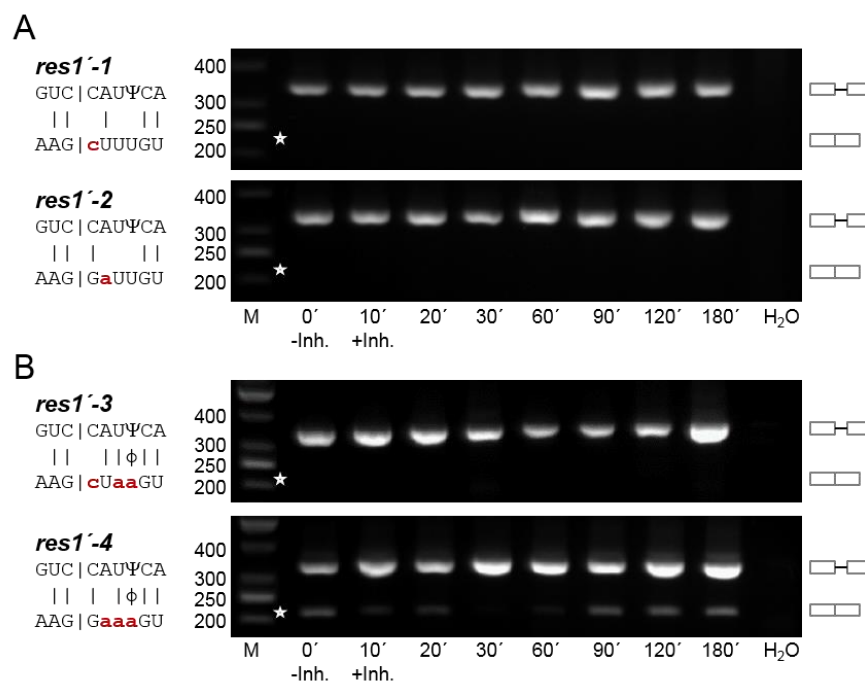


Abbildung 33| Das GU am Intronanfang ist essentiell für die Spleißreaktion

(A+B) Die RT-PCR zeigt, dass bei allen vier Mutationen (Positionen +1 und +2) hauptsächlich prä-mRNA detektiert wurde. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5' SS; Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; ϕ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des zu erwartenden mRNA Fragments

Bei dem Allel *res1*⁻¹ wurde die Base an Position +1 in ein Cytosin verändert, so dass keine Basenpaarung mit dem gegenüberliegenden Cytosin der snRNA mehr möglich ist (Abbildung 33A). Die RT-PCR zeigt, dass schon ohne Inhibition der Kinase ausschließlich prä-mRNA detektiert wird, was bedeutet, dass das Intron nicht mehr gespleißt wird. Wird das Uracil an Position +2 mutiert, zeigt sich das gleiche Bild. Es wird zu allen untersuchten Zeitpunkten ausschließlich prä-mRNA detektiert.

Um auszuschließen, dass die Introns *res1*⁻¹ und *res1*⁻² nicht mehr gespleißt werden, weil es zu wenig Basenpaarungen innerhalb der 5'-SS gibt, wurden zusätzlich die Basen an Position +3 und +4 zu Adenin mutiert und damit die Komplementarität erhöht (Abbildung 33B). Trotz der zwei zusätzlichen Basenpaarungen in der Mitte der 5'-SS wird ohne und mit Inhibitorzugabe hauptsächlich prä-mRNA amplifiziert. Dadurch bestätigt sich, dass das GU am Intronanfang essentiell für die Erkennung des Introns oder die Spleißreaktion selbst ist. Die fehlende Interaktion dieser beiden Basen mit der snRNA kann nicht durch zusätzliche Basenpaarungen an anderer Stelle ausgeglichen werden.

7.2.3 Eine zusätzliche Basenpaarung an Position +3 in der 5'-SS verwandelt *res1*⁻¹ in ein Prp4-unabhängiges Intron

Die Positionen +3 und +4, die bei dem *res1*⁺ Intron keine Interaktionen mit der U1 snRNA eingehen können, sind sowohl einzeln als auch beide zusammen von Uracil zu Adenin mutiert worden (Abbildung 34). Dadurch wird eine Interaktion mit der U1 snRNA möglich.

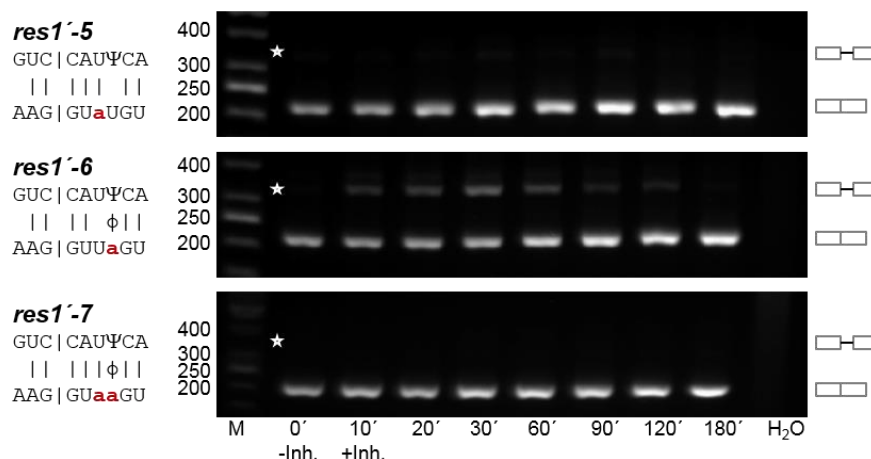


Abbildung 34| Eine Basenpaarung an Position +3 und/oder +4 erzeugt ein Prp4-unabhängiges Intron

Bei allen drei Mutationen, die eine Interaktion an Position +3 und/oder +4 ermöglichen, zeigt die RT-PCR trotz Inhibitor der Kinase (+Inh.) hauptsächlich mRNA, M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; φ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des prä-mRNA Fragments

Werden die Mutationen *resI*⁻⁵ und *resI*⁻⁷ betrachtet liegt zu allen untersuchten Zeitpunkten ausschließlich mRNA vor. Das bedeutet, dass eine Erhöhung der Komplementarität zur snRNA durch die zusätzliche Basenpaarung an Position +3 tatsächlich dazu führt, dass *resI*⁻ unabhängig von der Aktivität der Kinase gespleißt wird. Dass es nicht nur die Erhöhung der Anzahl an Interaktionen mit der snRNA ist, die eine Spleißstelle verbessert, sondern unterschiedliche Positionen von unterschiedlicher Bedeutung sind, deutet die RT-PCR der Mutation *resI*⁻⁶ an. Es wurde ebenfalls nur eine Base in der 5'-SS von Uracil zu Adenin mutiert, in diesem Fall die Base an Position +4. Dabei ist zu erkennen, dass ohne Inhibition der Kinase alle Transkripte vollständig gespleißt vorliegen, nach Inhibition allerdings ein sehr kleiner Teil von 10 bis 120 Min. nach Inhibition nicht mehr gespleißt wird. Das könnte bedeuten, dass die Interaktion zwischen A und Ψ an dieser Stelle die Gesamt-Interaktion der beiden RNAs zwar verbessert, aber nicht in gleichem Maße stabilisiert, wie die Basenpaarung von U und A an Position +3.

7.2.4 Mutationen in der 5'-SS von *resI*⁻⁷ führen erneut zu Abhängigkeit von der Prp4 Kinase

Nachdem es gelungen ist das ursprünglich Prp4-abhängige Intron des *resI*⁻ Gens durch zusätzliche Basenpaarungen an Position +3 und/oder +4 der 5'-SS Prp4-unabhängig zu machen, soll jetzt untersucht werden, ob weitere Mutationen in der 5'-SS eine erneute Prp4-Abhängigkeit herbeiführen können.

Als Ausgangskonstrukt dafür wurde die Mutation *resI*⁻⁷ gewählt, die insgesamt acht komplementäre Interaktionen zwischen der U1 snRNA und Exon1/5'-SS zeigt (Abbildung 34). Die drei Allele *resI*⁻⁸, *resI*⁻⁹ und *resI*⁻¹⁰, die in Abbildung 35 gezeigt sind, wurden an Position +5 mutiert, so dass sich die Komplementarität zur U1 snRNA verringert. An Position +5 befindet sich beim *resI*⁺, genau wie bei den meisten 5'-SS in *S. pombe*, ein Guanin. In den Prp4-abhängigen Introns allerdings ist an dieser Position seltener ein Guanin zu finden als bei den Prp4-unabhängigen (Abbildung 28, S.41). Diese Base wurde jeweils in eine der drei weiteren möglichen Basen mutiert. Alle drei Mutationen zeigen, dass ohne Inhibitorzugabe nahezu alle Transkripte gespleißt vorliegen, während von 10 bis 90 Min. nach Zugabe des Inhibitors prä-mRNA akkumuliert. Das bedeutet, dass eine Mutation an Position +5, die die Komplementarität zur snRNA verringert, das Spleißen des *resI*⁻ Transkripts erneut abhängig von der Aktivität der Prp4 Kinase macht.

Wird allerdings die *resI*^{-WT} 5'-SS verwendet, die nur vier Basenpaarungen eingehen kann und in dieser wird das Guanin an Position +5 in ein Cytosin mutiert (Abbildung 35, *resI*⁻¹¹),

ist die Interaktion der RNAs zu gering. Es wird auch schon ohne Inhibition ausschließlich prä-mRNA detektiert, was zeigt, dass das Intron nicht mehr gespleißt wird.

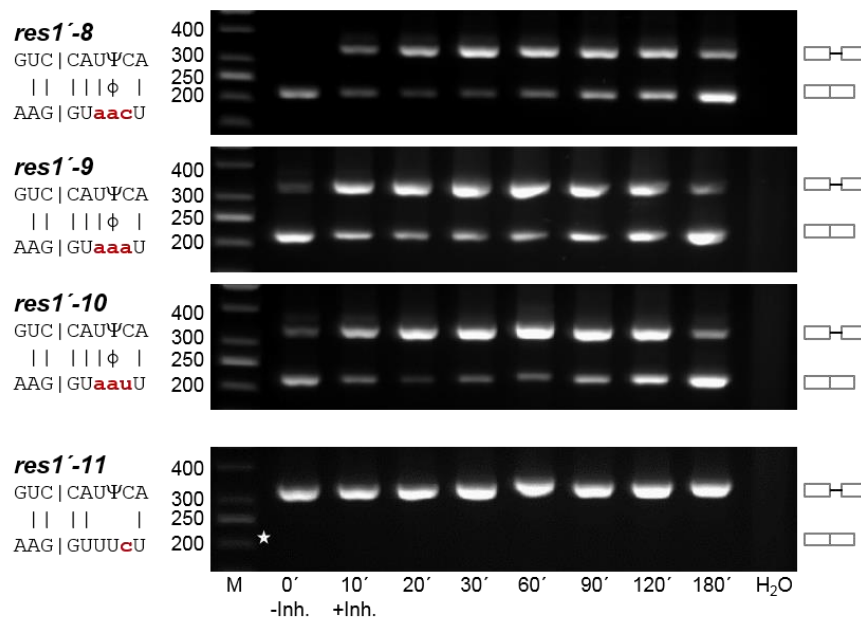


Abbildung 35| Ist keine Basenpaarung an Position +5 möglich, wird aus *res1*'-7 erneut ein Prp4-abhängig gespleißtes Intron

Fehlt die Basenpaarung an Position +5, wird das vorher Prp4-unabhängig gespleißte Transkript *res1*'-7 wieder zu einem Prp4-abhängig gespleißtem (*res1*'-8 bis *res1*'-10). Fehlt außerdem die Interaktion an Position +3 und +4 (*res1*'-11), führt die Mutation an Position +5 dazu, dass das Intron nicht mehr gespleißt wird. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA; Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; ϕ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des mRNA Fragments

Die in Abbildung 36 dargestellten Mutationen *res1*'-12 bis *res1*'-15 bilden die Serie der an Position +6 mutierten 5'-Spleißstellen. Bei den ersten drei Mutationen sind bis auf Position +6 alle restlichen Basen der 5'-SS komplementär zur U1 snRNA. Es zeigt sich hier, dass die Position +6 keinen Einfluss auf die Spleißeffizienz ausübt, wenn die anderen fünf Basen der 5'-SS komplementär sind. Es wird zu allen Zeitpunkten ausschließlich mRNA detektiert, was bedeutet, dass das Intron Prp4-unabhängig gespleißt wird. Bei der Mutation *res1*'-15, bei der wie beim *res1*'-WT die beiden Basenpaarungen an Position +3 und +4 fehlen, führt die Mutation an Position +6 dazu, dass das Intron auch ohne Inhibition der Kinase nicht mehr gespleißt wird.

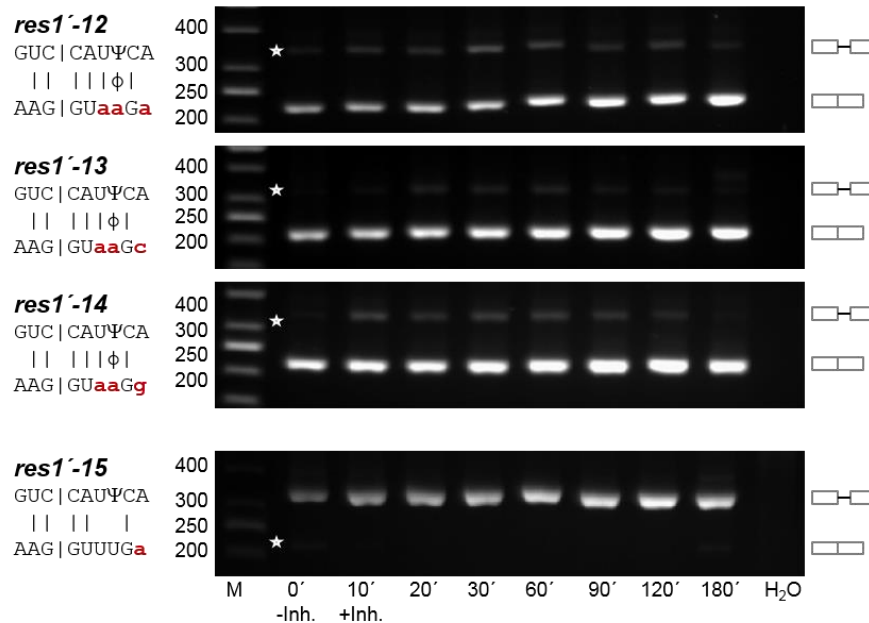


Abbildung 36| Sind fünf Basenpaarungen in der 5'-SS vorhanden, hat die Position +6 keinen Einfluss

Eine Basenpaarung an Position +6 ist nur notwendig, wenn nicht genügend Basenpaarungen mit der U1 snRNA bestehen, die die Bindung der RNAs stabilisieren. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA; Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; ϕ, A-Ψ Paarung; *, markiert die Position des zu erwartenden mRNA oder prä-mRNA Fragments

Insgesamt wird deutlich, dass genügend Basenpaarungen ausgebildet werden müssen, damit eine stabile Bindung der U1 snRNA mit der 5'-SS entsteht. Dabei scheinen nicht alle Positionen gleich bedeutend zu sein. Neben den unveränderlichen Positionen +1 und +2 spielen die Positionen +3 und +5 eine wichtigere Rolle, als +4 und +6. Ist eine 5'-SS an den Positionen +3 und +4 oder an Position +5 nicht komplementär zur U1 snRNA verbessert die Prp4 Kinase die Spleißeffizienz (Abbildung 35).

7.2.5 Der Exon-Intron-Übergang spielt eine entscheidende Rolle für die Spleißeffizienz

Da die Interaktion der U1 snRNA auch in das Exon1 hineinreicht, wurde untersucht, ob die letzten drei Basen des Exon1 die Spleißeffizienz des Introns beeinflussen. Als Ausgangskonstrukt wurde auch hier *res1'-7* (Abbildung 34, S. 47) gewählt, welches acht komplementäre Basen besitzt, wovon zwei im Exon1 liegen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt und so angeordnet, dass sich die Anzahl der komplementären Basen im Exon1 nach unten hin verringert.

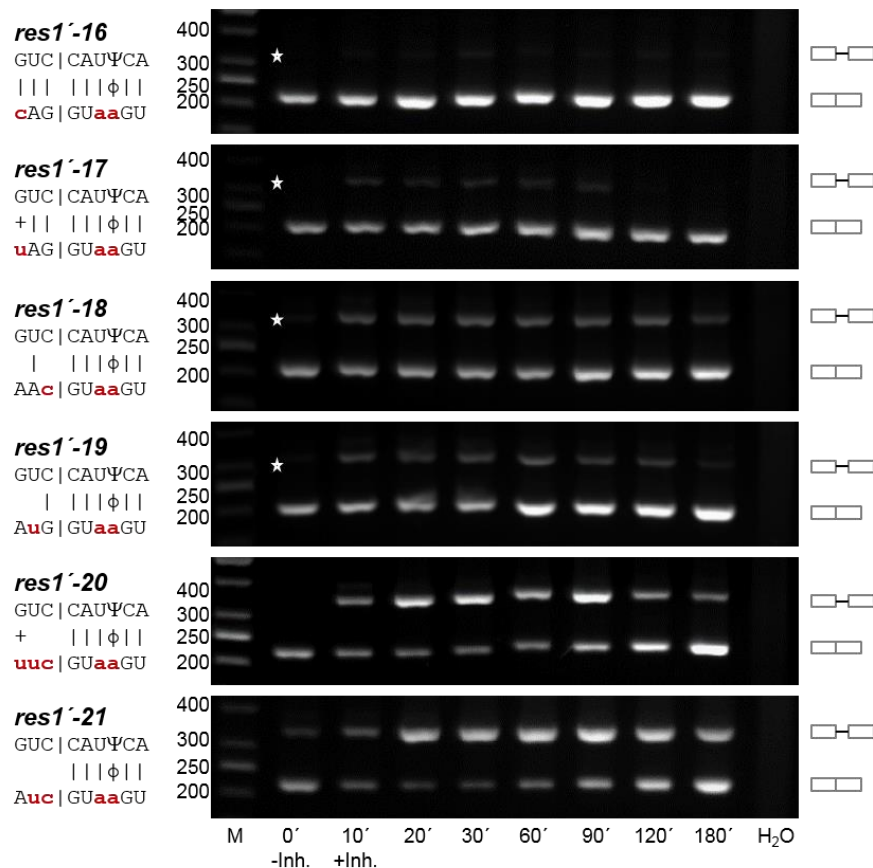


Abbildung 37| Im Exon1 muss mindestens eine Watson-Crick-Basenpaarung vorliegen, damit das Intron Prp4-unabhängig gespleißt wird

Die Anzahl der komplementären Basen im Exon1 verringert sich von oben nach unten. Liegt nur eine Wobble-Basenpaarung an -3 (*res1⁻²⁰*) oder keine Basenpaarung (*res1⁻²¹*) im Exon1 vor, wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA; Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und der Exon1/5'-SS; Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; Ψ, Pseudouridin; |, Watson-Crick Basenpaarung; φ, A-Ψ Paarung; +, schwache Interaktion zwischen G-U; *, markiert die Position des prä-mRNA Fragments

Bei dem Allel *res1⁻¹⁶* (Abbildung 37) sind alle drei Positionen im Exon1 komplementär zur U1 snRNA, während es bei *res1⁻⁷* nur die Positionen -1 und -2 sind (Abbildung 34, S. 47). Es wurde zu allen Zeitpunkten ausschließlich mRNA detektiert woraus sich ergibt, dass keine Prp4 Kinase benötigt wird. Wird nun erneut die Position -3 in ein Uracil mutiert (*res1⁻¹⁷*, Abbildung 37) kann sich eine Interaktion zwischen Guanin und Uracil ausbilden, die als Wobble-Basenpaarung bezeichnet wird und im Vergleich zu einer Watson-Crick-Bindung eine veränderte Struktur einnimmt (Varani & McClain, 2000). Auch hier konnte bei der RT-PCR hauptsächlich mRNA detektiert werden, womit das Intron Prp4-unabhängig gespleißt wird. Wird die Basenpaarungen auf eine Base im Exon1 an Position -1 oder -2 verringert (*res1⁻¹⁸* und *res1⁻¹⁹*) kann nach Inhibition ein Hauch von prä-mRNA detektiert werden, während der größte Teil effizient gespleißt wird. Beim Allel *res1⁻²⁰* wurden die Basen so verändert, dass

im Exon1 ausschließlich eine Wobble-Basenpaarung zwischen dem Uracil an Position -3 und dem Guanin der snRNA besteht. Diese Interaktion ist ausreichend, um ohne Inhibition der Kinase die prä-mRNA vollständig zu Spleißen. Wird die Prp4 Kinase inhibiert tritt von 10 bis 90 Min. eine Akkumulation von prä-mRNA auf. Das bedeutet, dass eine G-U Bindung an Position -3 nicht ausreicht, um ohne die Aktivität der Kinase das Intron effizient zu Spleißen. Liegt keine Basenpaarung im Exon1 vor (*res1*⁻²¹) entsteht auch hier ein Prp4-abhängiges Intron, das ohne die Aktivität der Kinase prä-mRNA akkumuliert.

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei einer aktiven Prp4 Kinase ausreichend ist, wenn die sechs im Intron liegenden Basen der 5'-SS eine Interaktion mit der U1 snRNA eingehen können um das Intron effizient herauszuspleißen. Wird allerdings die Kinase inhibiert, benötigt das Intron mindestens eine Watson-Crick-Basenpaarung im Exon1 an Position -1 oder -2, damit hauptsächlich mRNA vorliegt. Fehlt diese Interaktion, zeigt sich nach Inhibition der Kinase eine deutliche Akkumulation von prä-mRNA.

7.3 Konstruktion des Reportergens *ppk8*[']

Außer *res1* wurde das Prp4-unabhängige Gen *ppk8* als Reporter verwendet. Dabei wurde untersucht, ob es möglich ist ein ursprünglich Prp4-unabhängiges Intron durch Mutationen in der 5'-SS in ein Prp4-abhängiges Intron umzuwandeln.

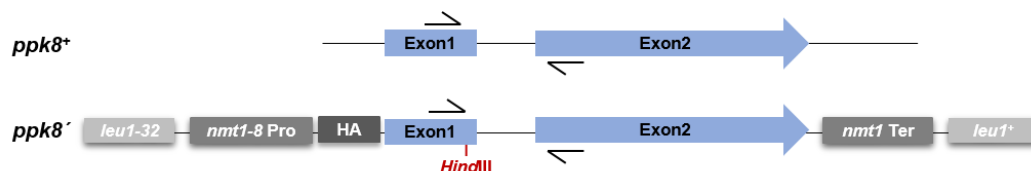


Abbildung 38| Die Allele *ppk8*⁺ und *ppk8*['] sind beide in der Zelle vorhanden

Schematische Darstellung der Gene *ppk8*⁺ und *ppk8*['] im Vergleich. Die Position der Primer, die für die RT-PCR verwendet wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die *HindIII* Schnittstelle wird für die Unterscheidung zwischen beiden Transkripten während der RT-PCR benötigt.

Das Gen *ppk8* wurde zuerst über *Bam*HI und *Mlu*I in den pUC19 Vektor kloniert und nach Mutagenese der 5'-SS in den pML81HA Vektor subkloniert (IV3.3.3, S. 88). Bei der Konstruktion wurde wie bei *res1*['] eine Leserasterverschiebung eingefügt, so dass kein funktionsfähiges Ppk8'-Protein gebildet werden kann. Abschließend wurde der Integrationsvektor pML81HA-*ppk8*['] mit *BSIWI* linearisiert und in den *leu1*-Lokus der Hefe integriert (Abbildung 38).

7.4 *ppk8'*, ein Reportergen, das ein Prp4-unabhängiges Intron besitzt

Bein Betrachtung der 5'-SS des *ppk8*⁺ Gens zeigt sich, dass *ppk8*⁺ sieben von neun möglichen Interaktionen mit der U1 snRNA eingehen kann (Abbildung 39).

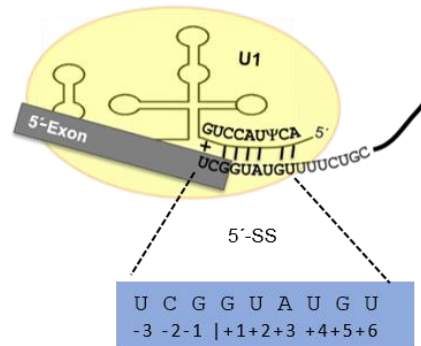


Abbildung 39| Interaktion der U1 snRNA mit der 5'-SS von *ppk8*⁺

Schematische Darstellung der Interaktion der U1 snRNA mit der 5'-SS und dem Exon1. In blau unterlegt ist ein vergrößerter Ausschnitt der 5'-SS, sowie die letzten 3 Basen des Exon1. Dabei angegeben ist die zukünftig verwendete Nummerierung der einzelnen Basen.

Zwei der Interaktionen liegen im Exon1, wobei die Interaktion an Position -3 zwischen einem Guanin und einem Uracil eine Wobble-Basenpaarung ist. Die restlichen fünf Interaktionen befinden sich im Intron, wobei keine Basenpaarung an Position +4 mit dem Pseudouridin vorliegt.

7.4.1 Das Spleißverhalten des *ppk8'*-WT Transkripts entspricht dem des *ppk8*⁺

Wie beim *res1*-Konstrukt wurde zuerst untersucht, ob die Spleißeffizienz des zusätzlich in den *leu1*-Lokus integrierten *ppk8'*-WT Transkripts der des *ppk8*⁺-Transkripts entspricht.

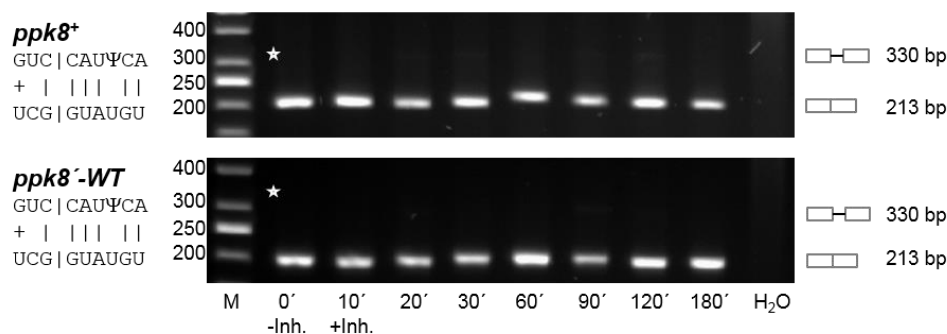


Abbildung 40| Bei *ppk8*⁺ und *ppk8'*-WT wird in der RT-PCR-Analyse nur mRNA detektiert

Beide Transkripte, *ppk8*⁺ und *ppk8'*-WT, zeigen ohne (-Inh.) und mit Inhibitorzugabe (+Inh.) ausschließlich mRNA. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; * markiert die Größe der prä-mRNA; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA mit den zu erwartenden Fragmentgrößen. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS. |, Watson-Crick Basenpaarung; +; G-U Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin

Dazu wurden die Primer so gewählt, dass bei der RT-PCR ausschließlich eines der beiden Gene betrachtet werden kann. Für prä-mRNA entsteht dabei ein Fragment von 330 bp und für mRNA liegt die Größe bei 213 bp (Abbildung 40).

Werden die in Abbildung 40 dargestellten Spleißmuster von *ppk8*⁺ und *ppk8*⁻WT verglichen ist zu erkennen, dass zu allen Zeitpunkten ausschließlich mRNA detektiert wurde und beide damit ein von der Prp4 Kinase unabhängiges Spleißen zeigen. Damit verhält sich *ppk8*⁻ im *leu1*-Lokus, wie *ppk8*⁺ im Wildtyp-Lokus und kann damit als Reportergen verwendet werden.

7.4.2 Bei Verringerung der Komplementarität zur U1 snRNA verschlechtert sich die Spleißeffizienz

Wie sich schon beim *res1*⁻ gezeigt hat, ist die Base an Position +1 der 5'-SS, ein Guanin, von besonderer Bedeutung für das Spleißen des Introns. Wird diese in ein Cytosin mutiert (Abbildung 41, *ppk8*⁻-1) ist bei der RT-PCR zu erkennen, dass zu allen Zeitpunkten ausschließlich prä-mRNA detektiert werden kann, was bedeutet, dass das Intron nicht mehr gespleißt wird.

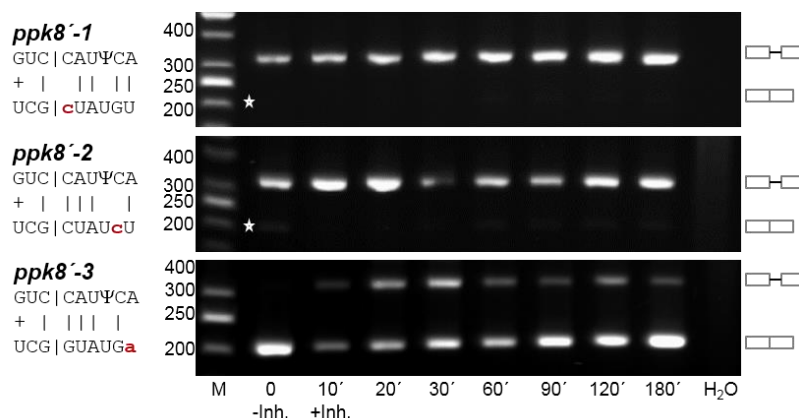


Abbildung 41| Wird *ppk8*⁻ an den Positionen +1 und +5 mutiert, wird das Intron auch ohne Inhibition der Kinase nicht mehr gespleißt

Eine Mutation an Position +6 dagegen führt zu Prp4-Abhängigkeit. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; * markiert die Größe der mRNA; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5' SS. Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; |, Watson-Crick Basenpaarung; +, G-U Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin

Wird die Position +5 von einem Guanin zu einem Cytosin mutiert (Abbildung 41, *ppk8*⁻-2), kann an dieser Stelle keine Interaktion mit der snRNA stattfinden. Das führt dazu, dass ausschließlich prä-mRNA amplifiziert und das Intron nicht mehr gespleißt wird. Wird die Position +6 (*ppk8*⁻-3) an der sich ein Uracil befindet in ein Adenin mutiert, wird aus dem

vormals Prp4-unabhängigen Intron ein Prp4-abhängiges Intron. Ohne Inhibitorzugabe wird nur mRNA detektiert. Nach Zugabe des Inhibitors ist eine Akkumulation von prä-mRNA sichtbar.

Im Folgenden wurden die Positionen +3 und +4 mutiert (Abbildung 42). Bei *ppk8*⁻⁴ wurde die Interaktion an Position +3 aufgehoben und eine neue an +4, gegenüber dem Pseudouridin, geschaffen. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Spleißeffizienz verschlechtert. Auch ohne Inhibitorzugabe kann eine kleine Menge prä-mRNA detektiert werden. Nach Zugabe des Inhibitors ist von 10 bis 90 Min. eine deutliche Akkumulation von prä-mRNA und ein Verschwinden der mRNA zu erkennen. Dies zeigt, dass der Wechsel einer Wasserstoffbrückenbindung von Position +3 zu Position +4 zu einem Prp4-abhängigen Intron führt. Damit wird erneut deutlich, dass nicht nur die Anzahl sondern auch die Position der Interaktionen eine Rolle spielt. Die Basenpaarung von U und A an Position +3 besitzt eine größere Bedeutung für die Spleißeffizienz, als die Interaktion von A und Ψ an Position +4.

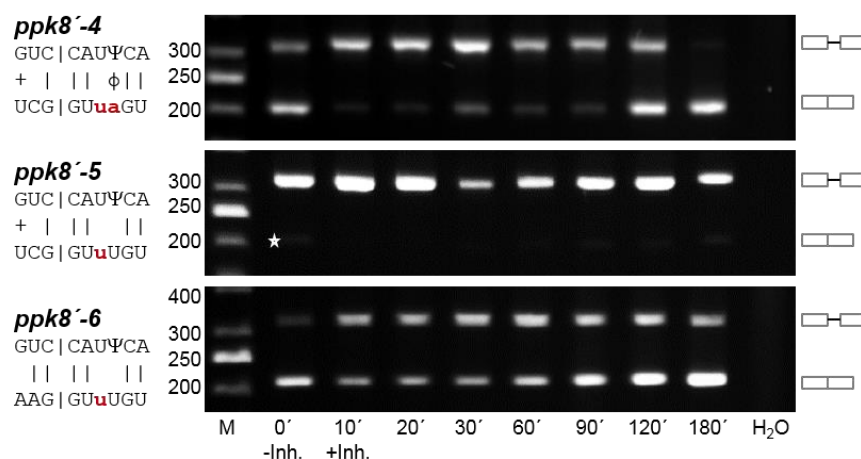


Abbildung 42| Die Erkennung einer schwachen 5'-SS wird durch zusätzliche Basenpaarungen im Exon1 verbessert

Wird die Basenpaarung an +3 entfernt und an +4 ermöglicht (*resI*⁻⁴), wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt. Kann keine Basenpaarung an +3 und +4 stattfinden (*resI*⁻⁵), wird zu allen Zeitpunkten prä-mRNA detektiert. Erhöht man die Komplementarität im Exon werden fehlende Basenpaarungen an +3 und +4 ausgeglichen (*resI*⁻⁶); M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; * markiert die Größe der mRNA; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5- SS; Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; |, Watson-Crick Basenpaarung; +; G-U Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin; ϕ, Ψ-A Paarung

Wird ausschließlich die Position +3 mutiert, *ppk8*⁻⁵, so dass keine Basenpaarung an +3 und +4 stattfindet, ist in der RT-PCR zu allen untersuchten Zeitpunkten nur prä-mRNA zu sehen. Die verbliebenen Interaktionen mit der snRNA reichen nicht aus, um das Intron zu spleißen.

Obwohl die 5'-SS von *ppk8*⁻⁵ der des *resI*⁺-Introns entspricht (Abbildung 32, S. 45), welches Prp4-abhängig gespleißt wird, hat sich gezeigt, dass das Intron *ppk8*⁻⁵ nicht mehr gespleißt

wird. Der Grund für dieses unterschiedliche Spleißverhalten könnte damit im Bereich des Exon1 liegen. Bei *resI*⁺ gibt es zwei aufeinander folgenden Basenpaarungen an den Positionen -1 und -2, während *ppk8*⁺ nur eine an Position -1 und eine Wobble-Basenpaarung von G und U an Position -3 besitzt. Um zu überprüfen, ob der Exon1 Bereich von *resI*⁺ die Erkennung des Introns verbessert, wurde beim Allel *ppk8*⁻⁶ sowohl die letzten drei Basen des Exon1, als auch die Sequenz der 5'-SS von *resI*⁺ übernommen. Werden nun *ppk8*⁻⁶ und *resI*⁺ verglichen (Abbildung 42 und Abbildung 32) zeigt sich ein identisches Spleißverhalten. Ohne Inhibitorzugabe wird bei beiden hauptsächlich mRNA detektiert, während von 10 bis 90 Min. prä-mRNA akkumuliert.

Bei Betrachtung aller Ergebnisse, die mit *ppk8*⁻ gemacht wurden, zeigt sich auch hier, dass Basenpaarungen an den Positionen +3 und +5 eine größere Bedeutung für die Erkennung des Introns haben, als Basenpaarungen an den Positionen +4 und +6. Weiterhin wird deutlich, welche wichtige Rolle die Interaktionen im Exon1 spielen. Während bei *resI*^{-WT} mit zwei Basenpaarungen im Exon1 vier Interaktionen im Intron ausreichen, um das Intron zu erkennen, müssen bei *ppk8*⁻, das im Exon1 eine Watson-Crick-Basenpaarung und eine Wobble-Basenpaarung besitzt, mindestens fünf Interaktionen vorliegen.

7.4.3 Mindestens eine Basenpaarung an Position -1 oder -2 im Exon1 ist erforderlich, damit *ppk8*⁻ Prp4-unabhängig gespleißt wird

Anhand von *resI*⁻ wurde schon gezeigt, dass bei einer vollständig komplementären 5'-SS mindestens eine Basenpaarung im Exon1 Bereich vorliegen muss, damit eine stabile Bindung mit der snRNA U1 entsteht und das Intron Prp4-unabhängig gespleißt wird. Bei *ppk8*⁻ soll jetzt untersucht werden, wie sich die Position der einzelnen Basenpaarung im Exon1 auf die Spleißeffizienz auswirkt. Dazu wurden drei Konstrukte hergestellt, *ppk8*⁻⁷, *ppk8*⁻⁸ und *ppk8*⁻⁹, die jeweils eine Interaktion im Exon1 eingehen können, sowie *ppk8*⁻¹⁰, das keine komplementären Basen im Exon1 besitzt (Abbildung 43).

Bei Betrachtung der RT-PCR Ergebnisse (Abbildung 43) zeigt sich, dass mit der *ppk8*⁺ 5'-SS eine Basenpaarung an den Positionen -1 oder -2 ausreicht, um das Intron weiterhin Prp4-unabhängig zu Spleißen. Befindet sich die einzelne Basenpaarung aber an Position -3 des Exon1 (*ppk8*⁻⁹) ist ohne Inhibition der Kinase ausschließlich mRNA zu finden, während sich mit Inhibitorzugabe nach 10 Min. die mRNA verringert und prä-mRNA akkumuliert. Das gleiche Ergebnis zeigt sich bei dem Allel *ppk8*⁻¹⁰, bei dem keine Basenpaarung im Exon1 besteht. Auch hier wird aus dem ursprünglich Prp4-unabhängigen *ppk8*⁺ ein Prp4-abhängiges

Intron. Dadurch bestätigt sich, dass mindestens eine Interaktion an den Positionen -1 und -2 im Exon1 vorhanden sein muss, damit das Intron Prp4 unabhängig gespleißt wird.

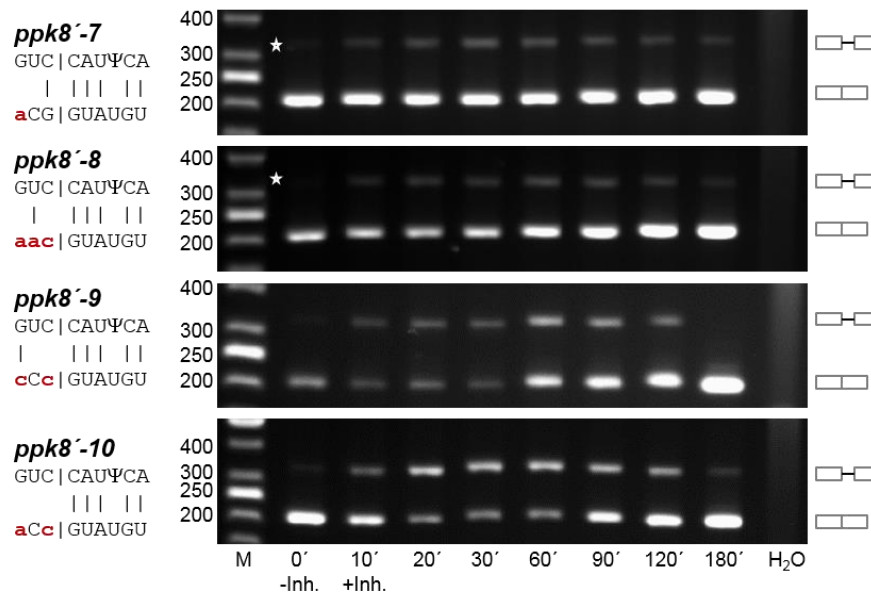


Abbildung 43| Eine Basenpaarung an den Positionen -1 oder -2 von *ppk8'* ist erforderlich, um Prp4-unabhängig gespleißt zu werden.

Besteht eine Basenpaarung im Exon1 an den Positionen -1 oder -2 (*ppk8'-7* und *ppk8'-8*) wird zu allen Zeitpunkten hauptsächlich mRNA detektiert. Kann nur an Position -3 eine Interaktion stattfinden (*ppk8'-9*) oder liegt keine Basenpaarung im Exon1 vor (*ppk8'-10*), ist ohne Inhibitorzugabe (-Inh.) nur mRNA vorhanden, während nach Inhibitorzugabe (+Inh.) prä-mRNA akkumuliert. M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; * markiert die Größe der prä-mRNA; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA und Exon1/5'-SS; Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; |, Watson-Crick Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin;

7.5 Eine starke Exon1/5'-SS kompensiert Mutationen in der BS von *res1'*

Bisher wurde ausschließlich das 5'-Ende des Introns betrachtet. Deswegen soll jetzt untersucht werden, welchen Einfluss die BS auf die Spleißeffizienz hat. Die BS interagiert während des Spleißens mit der snRNA des U2 Partikels (Parker et al, 1987; Wu & Manley, 1989). Diese Interaktion unterscheidet sich von der Basenpaarung zwischen dem Transkript und der U1 snRNA, da hier nur 4 Basen miteinander in Kontakt treten. Außerdem führt diese Basenpaarung dazu, dass das Adenin an Position 4 ausgestülpt wird (Abbildung 44) (Query et al, 1994). Bei Betrachtung der BS von *res1*, zeigt sich, dass *res1* die 4 möglichen Basenpaarungen mit der U2 snRNA eingehen kann. In *S. pombe* sind 13 verschiedene BS annotiert, wobei diejenige, die bei *res1* zu finden ist, am Häufigsten auftritt (Wood et al, 2012).

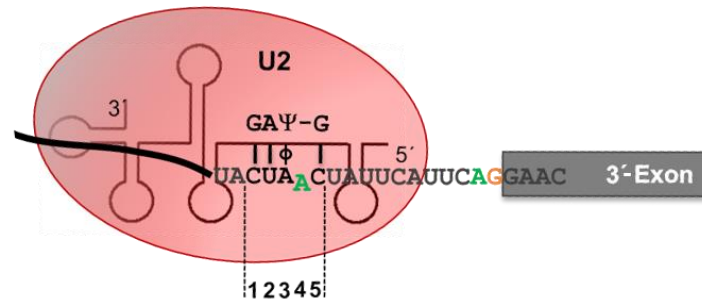


Abbildung 44| Interaktion der U2 snRNA mit der *resI* BS

Schematische Darstellung der Interaktion der U2 snRNA mit der BS des *resI*-Introns. Die konservierten Basen des BP und der 3'-SS sind farblich hervorgehoben. Dabei angegeben ist die zukünftig verwendete Nummerierung der einzelnen Basen. |, Watson-Crick-Paarung; Ψ, Pseudouridin, ϕ, A-Ψ Paarung.

Im Reporterergen *resI*⁻⁷ wurden insgesamt fünf Mutationen in der BS gesetzt, die mit Buchstaben bezeichnet wurden (Abbildung 45 und Abbildung 46). Die einzelnen Mutationen in der BS wurden sowohl mit der Wildtyp *resI*⁻⁷ Exon1/5'-SS (AAG|GUUUGU) als auch mit der *resI*⁻⁷ Exon1/5'-SS (AAG|GUAAGU) kombiniert. Während beim *resI*⁺ nur sechs von neun Basenpaarungen mit der U1 snRNA vorliegen, besitzt die *resI*⁻⁷ Exon1/5'-SS acht von neun möglichen Interaktionen. Die RT-PCR Ergebnisse der Kombinationen beider Exon1/5'-SS mit der BS sind jeweils im Vergleich dargestellt (Abbildung 45 und Abbildung 46).

Die ersten beiden Mutationen betreffen den BP und das angrenzende Adenin an Position 3 (Abbildung 45). Dabei wurde zuerst das Adenin des BPs in ein Uracil mutiert. Sowohl mit der *resI*⁺ Exon1/5'-SS als auch mit der *resI*⁻7 Exon1/ 5'-SS wird ohne und mit Inhibitorzugabe hauptsächlich prä-mRNA detektiert, was bedeutet, dass das Intron nicht mehr gespleißt wird.

Bei Mutation *resI*^{-B} wurde das Adenin neben dem BP in ein Uracil mutiert, so dass nur noch drei Interaktionen mit der U2 snRNA stattfinden können. Besitzt das Transkript die *resI*⁺ Exon1/5'-SS verschlechtert sich die Spleißeffizienz schon ohne Inhibition der Kinase. Nach Inhibitorzugabe akkumuliert die prä-mRNA vollständig, bis nach 180 Min. wieder mRNA detektiert werden kann. Wird dagegen die gleiche Mutation beim Allel *resI*^{-7B} betrachtet, welches die Exon1/5'-SS mit acht komplementären Basen hat, wird ohne Inhibition der Kinase der größte Teil des Transkripts gespleißt. Nach Inhibition der Kinase kommt es zu einer Akkumulation von prä-mRNA von 10 bis 90 Min. Nach 120 Min. ändert sich die Spleißeffizienz und mehr mRNA wird gebildet. Das bedeutet, wenn Position 3 keine Interaktion

mit der U2 snRNA eingehen kann, wird das vorher Prp4-unabhängige Intron erneut Prp4-abhängig gespleißt.

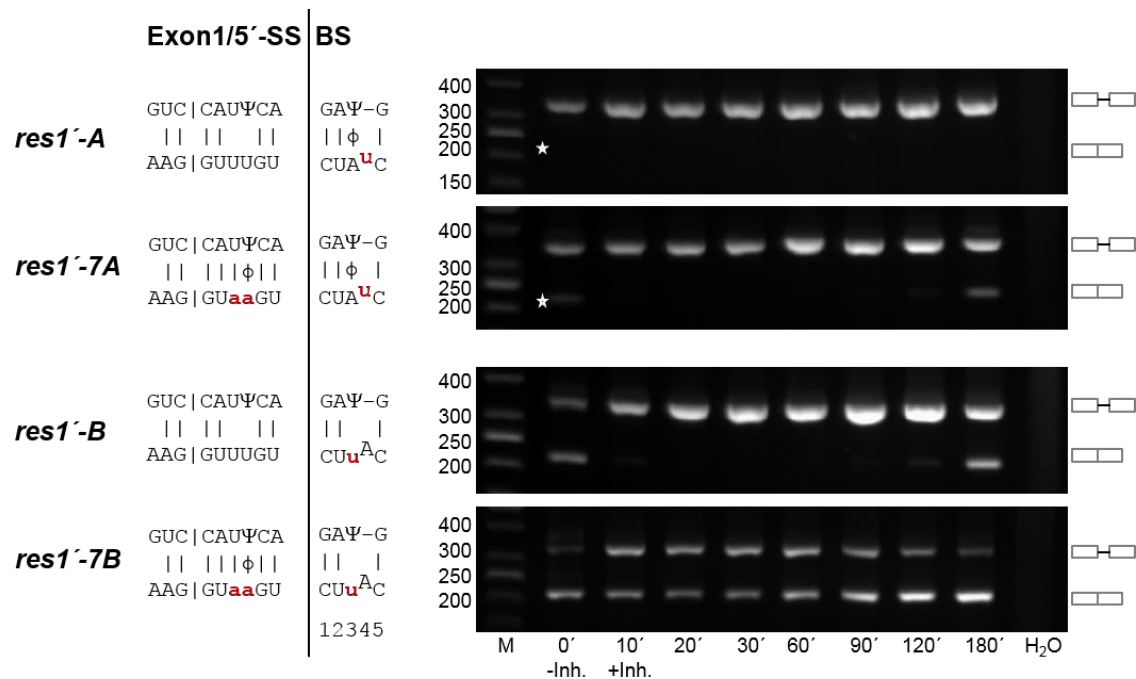


Abbildung 45| Mutationen in der BS an Position 3 können durch eine starke Exon1/5'-SS ausgeglichen werden

Wird der BP mutiert, kann mit beiden Exon1/5'-SS hauptsächlich prä-mRNA detektiert werden (*res1'-A* und *res1'-7A*). Wird Position +3 mutiert und mit der starken Exon1/5'-SS kombiniert, wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt (*res1'-7B*). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; * markiert die Größe der mRNA; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA mit der Exon1/5'-SS, sowie der U2 snRNA mit der BS; Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; Die Positionsnummern der einzelnen Basen sind angegeben; |, Watson-Crick Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin

Jetzt wurden die Basen an Position 1, 2 und 5 der *res1'* BS jeweils in ein Guanin mutiert (Abbildung 46). Im Allel *res1'-C* wurde das Cytosin an Position 1 mutiert, was dazu führt, dass hauptsächlich prä-mRNA vorliegt und das Intron schon ohne Inhibition der Kinase nicht mehr effizient gespleißt wird. Wird die gleiche Mutation in Kombination mit der *res1'-7* Exon1/5'-SS gesetzt, wird das Transkript ohne Inhibition der Kinase vollständig gespleißt. Nach Inhibition der Kinase akkumuliert eine geringe Menge an prä-mRNA. Dadurch zeigt sich, dass die Spleißeffizienz trotz Mutationen in der BS, die die Bindung der U2 snRNA verschlechtern, durch eine starke Exon1/5'-SS wesentlich verbessert werden kann.

Wird die Base an Position 2 mutiert (Abbildung 46, *res1'-D* und *res1'-7D*), die in allen *S. pombe* Sequenzen ein Uracil ist, zeigt sich in Kombination mit den beiden untersuchten

Exon1/5'-Spleißstellen das gleiche Ergebnis. Selbst ohne Inhibition der Kinase wird ausschließlich prä-mRNA detektiert und das Intron damit nicht mehr gespleißt.

Wird die letzte Base an Position 5 der BS von einem Cytosin in ein Guanin verändert (Abbildung 46, *res1*^{-E}), kann bei der RT-PCR zu allen untersuchten Zeitpunkten hauptsächlich prä-mRNA detektiert werden. Das bedeutet, dass in Kombination mit einer schwachen Exon1/5'-SS das Intron nicht mehr gespleißt wird. Besitzt das Transkript jedoch die starke *res1*⁻⁷ Exon1/5'-SS, wird es ohne Inhibition der Kinase vollständig gespleißt und auch nach Inhibition akkumuliert nur eine geringe Menge von prä-mRNA (Abbildung 46, *res1*^{-7E}). Dies zeigt erneut, dass eine starke Exon1/5'-SS, die in acht Basen komplementär zur U1 snRNA ist, Mutationen in der BS ausgleichen kann.

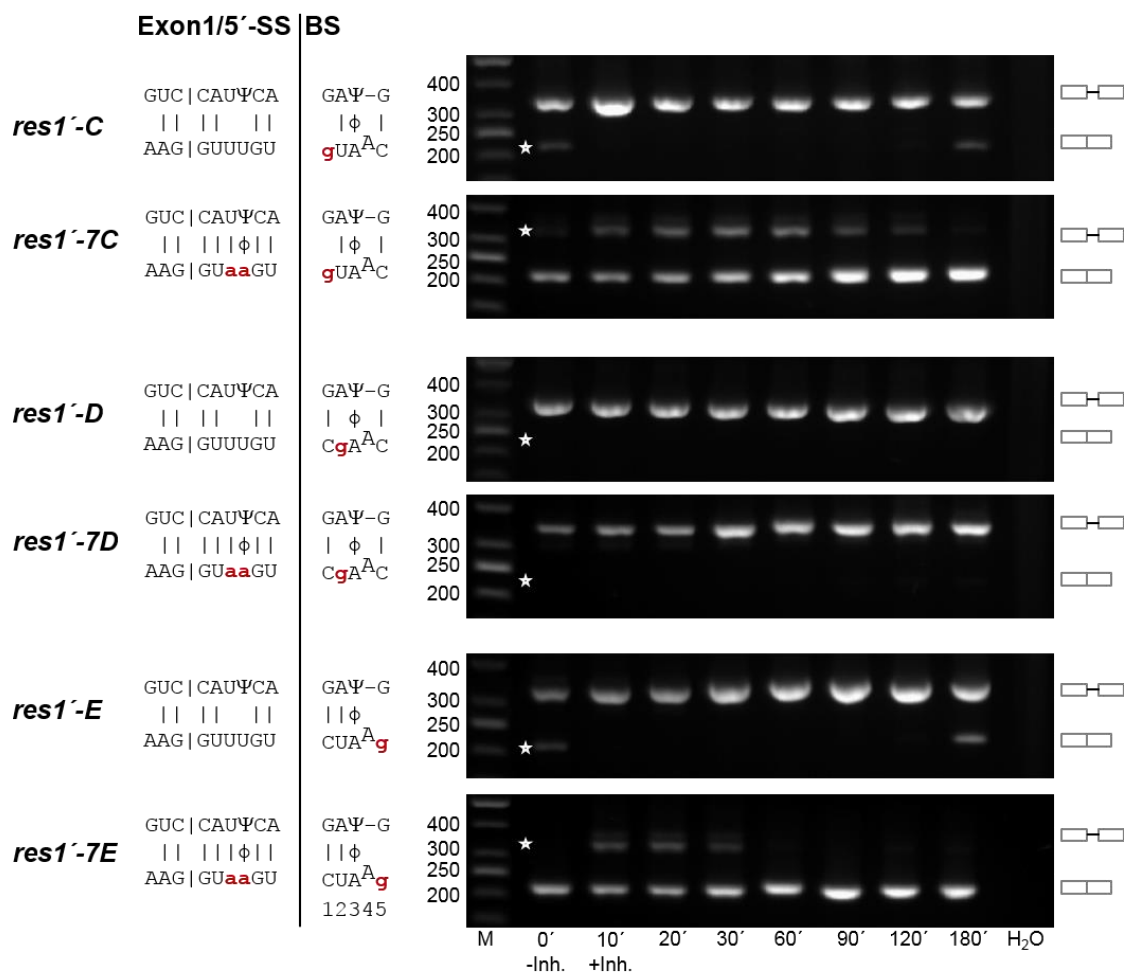


Abbildung 46| Mutationen an Position 1 und 5 der BS können durch eine starke Exon1/ 5'-SS kompensiert werden.

Eine Mutation an Position 2 führt mit beiden Exon1/5'-SS dazu, dass das Intron nicht mehr gespleißt wird (*res1*^{-D} und *res1*^{-7D}). Werden die Positionen 1 und 5 mutiert und eine starke Exon1/5'-SS liegt vor, wird das Intron Prp4-unabhängig gespleißt (*res1*^{-7C} und *res1*^{-7E}). M, Größenstandard; H₂O, Kontrollreaktion ohne RNA als Template; * markiert die Größe der mRNA oder prä-mRNA; Rechts: schematische Darstellung von prä-mRNA sowie mRNA. Links: Größenangaben des Standards und schematische Darstellung der Basenpaarung der U1 snRNA mit der Exon1/5'-SS, sowie der U2 snRNA mit der BS; Mutierte Basen sind dick gedruckt, rot und mit kleinen Buchstaben hervorgehoben; Die Positionsnummern der einzelnen Basen sind angegeben; |, Watson-Crick Basenpaarung; Ψ, Pseudouridin;

III Diskussion

Was genau die Rolle der Kinase, bei der Entfernung von Introns ist, ist bis heute unbekannt. Um die Funktion von Prp4 zu untersuchen, wurde eine analog-sensitive Kinase konstruiert, die sich durch einen ATP-analogen Inhibitor chemisch inhibieren lässt. Semi-quantitative RT-PCR Analysen und eine RNA-Sequenzierung haben gezeigt, dass die Inhibition der Prp4_{as2} Kinase nur bei einem Teil der Introns zu einer Akkumulation von prä-mRNA führt, während der andere Teil der Introns weiterhin effizient gespleißt wird. Es gibt keine Anhäufung von bestimmten Genfunktionsgruppen (GO) in einer der beiden Intronklassen. Und auch in der Introngröße sind keine Unterschiede erkennbar. Geringfügige Unterschiede zeigen sich ausschließlich beim Vergleich der Sequenz der Spleißstellen. Die anschließende Mutationsanalyse von Exon1/5'-SS und BS zeigt bei zwei verschiedenen Reportergenen eindeutig, dass die Aktivität der Prp4 Kinase benötigt wird, um die Introns zu spleißen, die schwache Spleißstellen besitzen.

1 Die Evolution spleißosomaler Introns

Zunächst stellt sich die Frage: Was sind schwache Spleißstellen und wie sind diese entstanden? Nachdem entdeckt wurde, dass Gene durch Introns unterbrochen sind, bildeten sich zwei verschiedene Hypothesen bezüglich der Entstehung von Introns. Diese wurden als *introns-early* und *introns-late* Hypothese bezeichnet. Gilbert (1987), der die *introns-early* Hypothese formuliert hat, ging davon aus, dass alle Introns sehr früh entstanden sind. Nach dieser Theorie soll ursprünglich sowohl das Genom von Eukaryoten als auch von Archaeen und Prokaryoten aus eigenständigen Exonkassetten bestanden haben, die durch Intronsequenzen voneinander abgegrenzt wurden. Da Prokaryoten und Archaeen heute entweder keine Introns oder nur wenige nicht-spleißosomale Introns besitzen, gehen die Unterstützer der *introns-early* Hypothese davon aus, dass in diesen beiden Reichen sowohl die spleißosomalen Introns als auch spleißosomale Komponenten im Lauf der Evolution verschwunden sind (Penny et al, 2009). Die *introns-late* Hypothese dagegen besagt, dass ausschließlich Eukaryoten Introns besitzen und diese zu verschiedenen Zeitpunkten der Evolution entstanden sind (Cavalier-Smith, 1985; Cavalier-Smith, 1987; Logsdon et al, 1995). Die aktuelle Sichtweise vereint Aspekte aus beiden Hypothesen und kann als *many introns early in eukaryotic evolution* bezeichnet werden (Rogozin et al, 2012). Demnach tauchen spleißosomale Introns zusammen mit der Entstehung von Eukaryoten auf und könnten von selbst-spleißenden Gruppe-II-Introns abstammen, die es schon in frühen Phasen des Lebens gab (Cech, 1986; Lambowitz & Zimmerly, 2011). Während der Endosymbiose könnten diese selbst-spleißenden Gruppe-II-Introns durch ein Mitochondrium in die eukaryotische Zelle gelangt sein (Cavalier-

Smith, 1991; Ku et al, 2015). Dort sind sie verblieben und haben sich vermehrt, was dazu geführt hat, dass auch heute mehr intronreiche als intronarme Organismen bekannt sind (Koonin, 2009). Bei den Organismen, die heute wenige Introns besitzen, wie z. B. Hefen, Insekten und Amöben, hat vermutlich irgendwann ein massiver Verlust von Introns stattgefunden (Rogozin et al, 2012). In diesen intronarmen Organismen haben bis heute insbesondere die Introns mit stark konservierten Spleißstellen überdauert. In dieser Arbeit ist *S. cerevisiae* als Beispiel für einen intronarmen Organismus beschrieben. Die 5'-Spleißstellen und die BS der Bäckerhefe werden zu den starken Spleißstellen gezählt. Sie weichen meist nur in einer Base von der Konsensussequenz ab und sind damit komplementär zur U1 und U2 snRNA (Abbildung 5, S. 10) (Bon et al, 2003). Die meisten Organismen heute sind intronreich, wie *S. pombe* und *H. sapiens*, und besitzen wenig konservierte und damit schwache Spleißstellen. Diese unterscheiden sich größtenteils in einer oder mehreren Basen von der Konsensussequenz und sind dadurch nicht vollständig komplementär zu den snRNAs. Dadurch, dass die Gruppe der Organismen überwiegt, die intronreich sind und schwache Spleißstellen besitzen, wird heute davon ausgegangen, dass schon der eukaryotische Vorfahr intronreich war und schwache Spleißstellen besaß (Irimia et al, 2007; Irimia & Roy, 2008; Rogozin et al, 2012; Rogozin et al, 2003).

Welche Konsequenz ergibt sich daraus für die Zelle? Bei der großen Anzahl von Introns mit stark variierenden Spleißstellen ist es sehr wahrscheinlich, dass Fehler im Spleißprozess auftreten können. Untersuchungen durch RNA-Sequenzierung zeigen aber, dass das Spleißosom sowohl im Menschen als auch in *S. pombe* Introns mit einer hohen Genauigkeit erkennt und nur eine geringe Fehlerrate auftritt (Bitton et al, 2015; Pickrell et al, 2010). Das deutet darauf hin, dass die Zelle Mechanismen entwickelt hat, die dem Spleißosom die Flexibilität geben sich auf verschiedene Transkripte mit variierenden Spleißstellen einzustellen. Wie das Spleißosom das bewerkstelligt, konnte bisher nicht beantwortet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass die Prp4 Kinase Teil eines Mechanismus ist, der die Erkennung von Introns verbessert, die schwache Spleißstellen besitzen.

2 Die Aktivität der Prp4 Kinase wird benötigt, um die Basenpaarung der U1 snRNA mit der Exon1/5'-SS zu stabilisieren

Die Bindung des U1 snRNPs an die Exon1/5'-SS ist der erste Schritt der Intronerkennung und hängt von verschiedenen Faktoren ab. (1) Der wahrscheinlich wichtigste Faktor ist die Stabilität der Bindung von U1 snRNA und Exon1/5'-SS durch komplementäre Basenpaarung zur

Festlegung des Intronanfangs (Roca et al, 2013; Roca et al, 2005; Séraphin et al, 1988; Zhuang & Weiner, 1986). (2) Diese Bindung wird zusätzlich durch das U1 Protein hsU1-C (spUsp103/scYhc1) stabilisiert, welches über Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen im Bereich -2 bis +3 der Exon1/5'-SS an die RNA-Doppelhelix bindet (Kondo et al, 2015; Pomeranz Krummel et al, 2009). (3) Auch die SR-Proteine spielen bei der Erkennung von Introns eine Rolle. Sie können an die prä-mRNA binden und abhängig von der Position der Bindung die Erkennung des Introns verbessern oder verschlechtern (Erkelenz et al, 2013; Kanopka et al, 1996; Shen & Mattox, 2012). Verschiedene Untersuchungen in HeLa-Zellen zeigen sogar, dass *in vitro* die Spleißreaktion einiger Transkripte durch Zugabe von SR-Proteinen wieder hergestellt werden kann, wenn der U1 snRNP abgebaut oder die U1 snRNA durch Zugabe komplementärer Oligonukleotide blockiert wird (Crispino et al, 1994; Tarn & Steitz, 1994). Und obwohl diese kurze Übersicht zeigt, dass ein Zusammenspiel vieler Faktoren bei der Auswahl der Exon1/5'-SS von Bedeutung ist, wird in dieser Arbeit bestätigt, dass die Komplementarität der U1 snRNA zur Exon1/5'-SS in *S. pombe* für die Intronerkennung entscheidend ist.

Eine Exon1/5'-SS besteht in *S. pombe* aus neun Basen wovon 3 im Exon1 (Position -3 bis -1) und sechs im Intron (Position +1 bis +6) liegen (Abbildung 5, S. 10). Die Basen, die beim Vergleich aller *S. pombe* Introns am häufigsten an den einzelnen Positionen auftreten, bilden die Konsensussequenz. Diese entspricht in *S. pombe* der Sequenz AAG/GUAAGU und ist von Position -2 bis +6 komplementär zur U1 snRNA (Abbildung 5, S. 10). Damit ein Intron als Intron erkannt und gespleißt werden kann, müssen sich genügend Basenpaare ausbilden, so dass eine stabile Bindung von prä-mRNA und snRNA entsteht. Wie viele und welche Basenpaarungen notwendig sind, damit das Spleißosom bei einer inaktiven Prp4 Kinase eine Spleißstelle noch erkennt und spleißt, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Die in der Exon1/5'-SS am stärksten konservierten Basen, sind das Guanin an Position +1 und das Uracil an Position +2. Werden diese beiden Basen mutiert, wird *in vitro* und *in vivo* das Intron nicht mehr gespleißt, was sich dadurch zeigt, dass prä-mRNA akkumuliert (Aebi et al, 1986; Lund & Kjems, 2002). Daher wurden in dieser Arbeit als Kontrolle die beiden ersten Basen einzeln mutiert (Abbildung 33, S. 46, *res1'-1* bis *res1'-4* und Abbildung 41, S. 54, *ppk8'-1*). Das führt dazu, dass das Intron nicht mehr gespleißt wird und ohne und mit Inhibition der Kinase ausschließlich prä-mRNA detektiert werden kann.

Die Base an Position +3 ist in 92 % der *S. pombe* Introns ein Adenin, während an Position +4 Adenin zwar am Häufigsten auftritt, aber nur in 50 % der Introns zu finden ist. Bei *res1⁺* und

resI^{-WT} (Abbildung 32, S. 45) ist an diesen beiden Positionen keine Basenpaarung mit der U1 snRNA möglich, womit sich hier die Anzahl der Basenpaarungen auf sechs reduziert. Das führt dazu, dass das Intron die Prp4 Kinase Aktivität benötigt, um gespleißt zu werden. Werden die beiden Basen einzeln mutiert, so dass entweder eine Basenpaarung an Position +3 oder +4 besteht, treten bei *resI*⁻⁵ und *resI*⁻⁶ insgesamt sieben Basenpaarungen auf (Abbildung 34, S. 47). Diese zusätzlichen zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der U1 snRNA reichen aus, damit beide Introns unabhängig von der Kinase gespleißt werden. Auffällig dabei ist, dass *resI*⁻⁶, welches die Basenpaarung an +4 besitzt, nach Inhibition der Kinase eine geringe Menge prä-mRNA akkumuliert, die bei *resI*⁻⁵ nicht detektiert werden kann. Diese Tendenz wird am Beispiel des Reporter-Gens *ppk8*⁻ noch eindeutiger. Liegt eine Basenpaarung an +3 vor (Abbildung 40, S. 53, *ppk8*^{-WT}) wird das Intron Prp4-unabhängig gespleißt. Besteht dagegen eine Basenpaarung an Position +4 (Abbildung 42, S. 55, *ppk8*⁻⁴) wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt. Obwohl in beiden Fällen zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können, an Position +3 zwischen U und A und an +4 zwischen Ψ und A (Gu et al, 1996), hat die Bindung an Position +3 eine andere funktionelle Bedeutung. Da eine Bindung an der ein Pseudouridin beteiligt ist eine höhere thermische Stabilität hat, als eine Watson-Crick-Paarung, ist dieses Ergebnis überraschend (Kierzek et al, 2014). Möglicherweise verändert die Interaktion mit dem Pseudouridin die Helixstruktur an dieser Stelle und stabilisiert dadurch die Paarung der beiden RNAs nicht in gleichem Maße wie eine Basenpaarung an Position +3 (Davis, 1995; Hudson et al, 2013).

An Position +5 befindet sich in 89 % der *S. pombe* Introns ein Guanin. Dieses kann drei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Cytosin der U1 snRNA eingehen und trägt dadurch zur Stabilisierung der Bindung am 5' Ende der U1 snRNA bei. Beim Vergleich der Sequenzlogos von Prp4-unabhängigen mit Prp4-abhängigen Introns ist die Position +5 eine der Positionen, die in Prp4-unabhängigen Genen stärker konserviert ist (Abbildung 28, S. 41). In der Mutationsanalyse zeigt sich, dass ein Intron, bei dem kein Guanin an Position +5 vorliegt, nur dann gespleißt wird, wenn die Prp4 Kinase aktiv ist und an den restlichen Positionen (-2 bis +6) Basenpaare ausgebildet werden können (Abbildung 35, S. 49, *resI*⁻⁸ bis *resI*⁻¹⁰). Ist die Prp4 Kinase nicht aktiv, akkumuliert hier prä-mRNA. Fehlen zusätzlich zu +5 die Basenpaarungen an den Positionen +3 und/oder +4, wird auch ohne Inhibition der Kinase nicht mehr gespleißt (Abbildung 35, S. 49, *resI*⁻¹¹ und Abbildung 41, S. 54, *ppk8*⁻²).

An Position +6 können alle Basen auftreten, wobei Uracil mit 33 % am Häufigsten vorkommt. Auch an Position +6 ist die Konservierung dieses Uracils in Introns höher, die unabhängig von

der Kinase gespleißt werden (Abbildung 28, S. 41). Die Mutationsanalyse zeigt allerdings, dass eine Basenpaarung an +6 nicht notwendig ist, wenn die Basen kontinuierlich von -2 bis +5 komplementär zur U1 snRNA sind (Abbildung 36, S. 50, *res1*⁻¹² bis *res1*⁻¹⁴). Selbst nach Inhibition der Kinase wird das Intron noch effizient gespleißt. Liegt dagegen keine Basenpaarung an Position +4 und +6 vor reicht die Stabilität nicht aus und das Intron benötigt die Aktivität der Kinase um gespleißt zu werden (Abbildung 41, S. 54, *ppk8*⁻³). Ist weder an +3, +4 und +6 eine Basenpaarung möglich, akkumuliert prä-mRNA und das Intron wird nicht mehr gespleißt, auch wenn die Kinase aktiv ist (Abbildung 36, S. 50, *res1*⁻¹⁵).

Obwohl an der Basenpaarung der U1 snRNA mit der prä-mRNA auch die letzten drei Basen des Exon1 beteiligt sein können, sind diese in *S. pombe*, im Vergleich zu den sechs Basen der 5'-SS, nicht konserviert und treten zufällig auf (Abbildung 5, S. 10). Deswegen ist es unklar, ob überhaupt und wenn ja, welche Basen zur Intronerkenung beitragen. Durch die verschiedenen Mutationen im Exon1 wird deutlich, dass bei einer aktiven Prp4 Kinase keine Interaktion im Exon1 mit der U1 snRNA benötigt wird, wenn im Intron fünf (Abbildung 43, S.57, *ppk8*⁻¹⁰) oder sechs (Abbildung 37, S. 51, *res1*⁻²¹) Basenpaarungen vorliegen. Wenn im Exon1 nur eine Basenpaarung an Position -1 (Abbildung 37, S. 51, *res1*⁻¹⁹ und Abbildung 43, S. 57, *ppk8*⁻⁷) oder -2 (*res1*⁻¹⁸ und *ppk8*⁻⁸) besteht und mindestens fünf oder sechs Basenpaarungen in der 5' SS vorhanden sind, ist das Intron Prp4-unabhängig. Nach Inhibition der Kinase verschlechtert sich die Spleißeffizienz hier nur geringfügig. Obwohl bisher vermutet wurde, dass die letzten drei Basen des Exon1 für die Basenpaarung mit der U1 snRNA notwendig sind, zeigen die nächsten Ergebnisse, dass die Base an Position -3 bei der Intronerkenung keine Rolle spielt. Die Reportergene, bei denen keine Basenpaarung im Exon1 möglich ist (*res1*⁻²¹ und *ppk8*⁻¹⁰) werden Prp4-abhängig gespleißt. Das gleiche Ergebnis zeigt sich, wenn nur eine Basenpaarung an Position -3 im Exon1 besteht (*res1*⁻²⁰ und *ppk8*⁻⁹). Auch hier wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt. Das deutet darauf hin, dass eine Basenpaarung an Position -3 die Bindung der U1 snRNA nicht zusätzlich stabilisiert. Da die Base der U1 snRNA, die zur Position -3 komplementär ist, die letzte Base vor dem Stem-Loop I ist, ist es möglich, dass sie nicht mehr an der Bindung der beiden RNAs beteiligt ist (Abbildung 5, S. 10) (Porter et al, 1990). Das zeigt, dass nur die Basenpaarungen von -2 bis +6 relevant sind. Sind nur vier Basenpaarungen innerhalb des Introns vorhanden (Abbildung 42, S. 55, *ppk8*⁻⁵) reicht eine Basenpaarung an Position -1 und eine *Wobble*-Basenpaarung an -3 trotz aktiver Kinase nicht aus, um das Intron zu spleißen. Bestehen zu den vier Basenpaarungen im Intron noch zwei Basenpaarungen an -1 und -2 wird das Intron Prp4-abhängig gespleißt (Abbildung 32, S. 45, *res1*^{-WT} und Abbildung 42, S. 55, *ppk8*⁻⁶). Das zeigt, dass

Basenpaarungen im Exon1 an den Positionen -1 und -2 wichtig sind und fehlende Basenpaarung mit der U1 snRNA in der 5'-SS ausgleichen können.

Auch nachdem das *resI*⁺ Intron über die *StuI*-Restriktionsschnittstelle in das intronlose *ura4*-Gen kloniert wurde, zeigt sich, dass eine geringere Anzahl an Basenpaarungen im Exon1 die Spleißeffizienz verschlechtern kann (Abbildung 29, S.42). Die Exon1/5'-SS des *ura4-resI*-Intron Konstrukts besitzt dadurch die Sequenz AGG/GUUUGU und damit eine komplementäre Base weniger im Exon1 an Position -2 als bei *resI*⁺ (AAG/GUUUGU). Dies führt dazu, dass das Intron im *ura4*-Lokus schon ohne Inhibition der Kinase nicht effizient gespleißt wird. Nach Inhibition der Kinase verschlechtert sich die Spleißeffizienz und prä-mRNA akkumuliert. Das bedeutet, dass das Intron weiterhin Prp4-abhängig gespleißt wird. Bei der Integration des Prp4-unabhängigen *ade2*-II-Introns (Abbildung 26A, S. 39) in den *ura4*-Lokus reduziert sich die Anzahl der Basenpaarung im Exon1 von drei (CAG/GUAUGU) auf eine an Position -1 (AGG/GUAUGU). Die RT-PCR Analyse zeigt, dass das Intron auch weiterhin Prp4-unabhängig gespleißt wird. Demnach reichen die fünf Basenpaare innerhalb des Introns und eine Basenpaarung an -1 aus, damit das Intron auch im *ura4*-Lokus Prp4-unabhängig gespleißt wird.

Insgesamt zeigt die Mutationsanalyse deutlich, dass die Aktivität der Prp4 Kinase die Bindung der U1 snRNA an die Exon1/5'-SS stabilisiert, wenn die Anzahl und Zusammensetzung der komplementären Basen alleine für eine stabile Bindung der U1 snRNA nicht ausreicht. Dabei sind auch die Basen im Exon1 an den Positionen -1 und -2 von Bedeutung. Diese tragen zur Stabilität der Interaktion bei, insbesondere dann, wenn innerhalb des Introns wenig Komplementarität vorliegt. Außerdem ist zu erkennen, dass nicht alle Basenpaarungen die gleiche Bedeutung für die Stabilität der Bindung von U1 snRNA und Exon1/5'-SS haben. Neben den beiden unveränderlichen Basen an Position +1 und +2 im Intron scheinen die Positionen +3 und +5 von größerer Bedeutung zu sein, als eine Basenpaarung an +4 oder +6.

3 Die Prp4 Kinase kontrolliert die Bindung des U1 und U2 snRNPs an der prä-mRNA

Im Gegensatz zur Erkennung der Exon1/5'-SS wird die BS nicht im ersten Schritt durch eine RNA-RNA-Interaktion markiert. Während U1 an die Exon1/5'-SS assoziiert, erkennt und bindet das Protein Bpb1 (scMsl5/hsSF1) an die BS und ein Heterodimer, bestehend aus Prp2 (scMud2/hsU2AF2) und Uaf2 (hsU2AF1), lagert sich an den Pyrimidin-Trakt und die 3'-SS an

(Berglund et al, 1998; Berglund et al, 1997; Wu et al, 1999). Damit das Protein Bpb1 (scMsl5/hsSF1) stabil an die BS binden kann, wird es durch die Kinase spDsk1 (scSky1/hsSRPK1/2/3) phosphoryliert (Lipp et al, 2015). Das BP Adenosin wird hier schon festgelegt und interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptidrückgrat des Proteins Bpb1 (scMsl5/hsSF1) (Liu et al, 2001). Währenddessen bildet die U2 snRNA eine Haarnadelstruktur aus, die als BS-Loop bezeichnet wird. Die Basen, die Wasserstoffbrücken mit der BS ausbilden können, befinden sich in der ungepaarten Schleife des BS-Loops. Durch diese Struktur werden die Basen auf der Oberfläche präsentiert und ermöglichen eine erste schwache Bindung an die BS, die zur Verdrängung von Bpb1 (scMsl5/hsSF1) führt. Um die Bindung zu stabilisieren, verschwindet die Haarnadelstruktur, so dass sich jetzt eine U2 snRNA-Intron-Doppelhelix bilden kann (Perriman & Ares, 2010). Die Konsensussequenz der BS entspricht in *S. pombe* der Basenfolge CUAAC und kann vier Basenpaarungen mit der U2 snRNA eingehen (Abbildung 44, S. 58, Position 1-3 und 5). Gegenüber dem Adenin an Position 3 der BS befindet sich dabei in der U2 snRNA ein Pseudouridin (Gu et al, 1996). Newby and Greenbaum (2002) haben in *S. cerevisiae* mittels NMR-Analyse die U2 snRNA-Intron-Helix untersucht und deren Struktur mit und ohne Pseudouridinylierung der U2 snRNA miteinander verglichen. Nur wenn sich dabei an dieser Stelle in der U2 snRNA ein Pseudouridin befindet, verändert sich die Orientierung des benachbarten ungepaarten BP-Adenosins, so dass es eine extra-helikale Konformation einnimmt und ausgestülpt wird (Abbildung 44, S. 58, Position 4 der BS). Diese Konformationsänderung könnte den nukleophilen Angriff auf die 5'-Spleißstelle erleichtern und damit die erste Spleißreaktion auslösen.

Da bisher gezeigt werden konnte, dass die Aktivität der Prp4 Kinase bei der Interaktion des U1 snRNPs mit schwachen Exon1/5'-SS von Bedeutung ist, stellte sich die Frage, ob die Kinase auch die Bindung der U2 snRNA an die BS beeinflusst. Werden die Sequenzlogos von Prp4-unabhängigen Introns mit Prp4-abhängigen verglichen, sind die Unterschiede in der BS gering, aber dennoch vorhanden (Tabelle 21, S. 121, Tabelle 22, S. 122). Deshalb wurde die Spleißeffizienz des *res1*' Gens überprüft, nachdem Mutationen in der BS eingefügt wurden, die die Komplementarität zur U2 snRNA verringern. Weiterhin wurde getestet, ob eine starke Exon1/5'-SS die Mutationen in der BS kompensieren kann und dadurch die Spleißeffizienz verbessert. Die Mutationen in der BS wurden dazu im Vergleich sowohl mit der *res1*'-WT Exon1/5'-SS (Abbildung 32, S. 45), einer schwachen Spleißstelle, als auch mit der *res1*'-7 Exon1/5'-SS (Abbildung 34, S. 47), einer starken Spleißstelle, kombiniert.

Wird der BP, also das konservierte ungepaarte Adenin an Position 4 in ein Uracil mutiert, zeigt sich, dass das Intron, welches die schwache Exon1/5'-SS besitzt, unabhängig davon, ob die Kinase inhibiert ist oder nicht, nicht mehr gespleißt wird (Abbildung 45, S. 59, *resI*'-A). Liegt die starke Exon1/5'-SS vor, wird ohne Inhibition der Kinase und 180 Min. nach Inhibition eine geringe Menge Transkript gespleißt, während der größte Teil als prä-mRNA akkumuliert (*resI*'-7A). Ein ähnliches Ergebnis ergibt sich, wenn das zu 100 % konservierte Uracil an Position 2 in ein Guanin mutiert wird (Abbildung 46, S. 60, *resI*'-D und *resI*'-7D). Das Intron wird unabhängig von der Aktivität der Kinase und auch unabhängig davon, ob eine schwache oder starke Exon1/5'-SS vorliegt, nicht mehr gespleißt. Das zeigt, dass ein Uracil an Position 2 ebenso essentiell für den Spleißprozess ist, wie das Adenin an Position 4, welches den BP bildet.

Liegt eine schwache Exon1/5'-SS vor und das Adenin an Position 3 (Abbildung 45, S. 59, *resI*'-B), welches dem Pseudouridin der U2 snRNA gegenüber steht, wird mutiert, wird das Intron ohne Inhibition der Kinase und 180 Min. nach Inhibition sehr ineffizient gespleißt. Von 10 bis 120 Min. nach Inhibition der Kinase wird nur prä-mRNA detektiert. Das gleiche Ergebnis zeigt sich, wenn das Reportergen die schwache Exon1/5'-SS besitzt und die Basen an Position 1 und 5 der BS mutiert werden (Abbildung 46, S. 60, *resI*'-C und *resI*'-E). Das bedeutet, wenn beide, Exon1/5'-SS und BS, schwach ausgebildet sind, reicht die Stabilität beider Bindungen nicht aus, um das Intron effizient herauszuspleißen.

Besitzt das Intron eine starke Exon1/5'-SS und die Position 3 der BS wird mutiert, führt das zu Prp4-Abhängigkeit (Abbildung 45, S. 59, *resI*'-7B). Damit wird zum ersten Mal deutlich, dass die Aktivität der Prp4 Kinase die Spleißeffizienz auch dann verbessert, wenn die BS mutiert ist. Dadurch wird klar, dass die Aktivität der Prp4 Kinase sowohl die Bindung der U1 snRNA an die Exon1/5'-SS stabilisiert, als auch die Bindung der U2 snRNA an die BS.

Werden die beiden äußeren Basen der BS, das Cytosin an Position 1 oder an Position 5, in ein Guanin mutiert und verringert sich dadurch die Anzahl der komplementären Basen zur U2 snRNA, werden die Reportergene, die eine starke Exon1/5'-SS besitzen Prp4-unabhängig gespleißt (Abbildung 46, S. 60, *resI*'-7C und *resI*'-7E). Die Spleißeffizienz verschlechtert sich nach Inhibition geringfügig, dennoch ist hauptsächlich mRNA zu finden.

Hier zeigt sich zum einen, dass eine starke Exon1/5'-SS, im Vergleich zu einer schwachen Exon1/5'-SS, die Spleißeffizienz verbessern kann, wenn die BS mutiert ist. Das bedeutet, dass eine stabile Bindung der U1 snRNA am Intronanfang die Intronerkennung ermöglicht, auch wenn die BS nicht der Konsensussequenz entspricht. Zum anderen wird auch hier deutlich, dass

ähnlich wie bei der Basenpaarung von Exon1/5'-SS und U1 snRNA, nicht alle Basenpaarungen die gleiche Bedeutung für die Bindung der U2 snRNA haben. Neben den beiden unveränderlichen Basen, dem Adenin am BP an Position 4 und dem Uracil an Position 2, führt die Mutation von Position 3 zu Prp4-Abhängigkeit, während das Intron bei Mutationen an Position 1 und 5 Prp4-unabhängig gespleißt wird. Das zeigt, dass eine Bindung an Position 3 eine größere Bedeutung für die Bindung der U2 snRNA hat, als Bindungen an den Positionen 1 und 5.

4 Prp1 und Srp2 könnten die Interaktion von Spleißosom und prä-mRNA stabilisieren

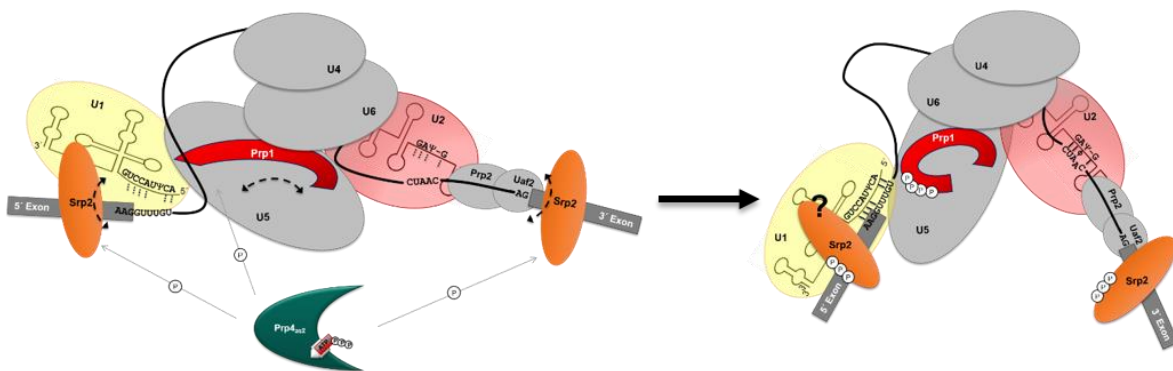
Die Mutationsanalyse zeigt, dass die Aktivität der Kinase sowohl die Bindung der U1 snRNA an die Exon1/5'-SS stabilisiert als auch die Interaktion der U2 snRNA mit der BS beeinflusst. Da die Kinase nicht direkt am Spleißosom assoziiert ist, stellt sich die Frage wie die Kinase diese Aufgabe erfüllt? Bisher sind in *S. pombe* die beiden Proteine Prp1 (scPrp6/hsU5-102K) und Srp2 (hsSRSF4/5/6) als Substrate der Prp4 Kinase bekannt (Lützelberger & Käufer, 2012; Schwelnus et al, 2001). Was aber die Konsequenz der Phosphorylierung von Prp1 und Srp2 durch die Kinase ist, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar und kann nur als hypothetisches Modell diskutiert werden.

Das Substrat Prp1 (scPrp6/hsU5-102K) befindet sich direkt am Spleißosom und kann in *S. pombe* an einem tetra-snRNP und dem prä-katalytischen Spleißosom nachgewiesen werden (Carnahan et al, 2005; Lützelberger et al, 2010). Die RT-PCR Analyse mit dem temperatursensitiven Allel *prp1-127^{ts}* deutet an, dass Prp1 auch bei der Erkennung von schwachen Spleißstellen involviert ist (Abbildung 24, S. 36). Dabei zeigt eine kleine Auswahl von Introns, dass bei der restriktiven Temperatur die Prp4-unabhängigen Introns *rpl29*, *res2* und *cdc2* hauptsächlich mRNA zeigen, während die Prp4-abhängigen Introns *res1* und *tbp1*-III, genau wie bei der chemischen Inhibition der Kinase, prä-mRNA akkumulieren. Eine mögliche Hypothese wäre, dass die Multi-Phosphorylierung im N-Terminus von Prp1 durch die Prp4 Kinase dessen Konformation verändert (Abbildung 47, S. 70). Diese Konformationsänderung könnte es dem Spleißosom ermöglichen sich flexibel den verschiedenen Transkripten mit variierenden Spleißstellen anzupassen, so dass eine stabile Bindung von prä-mRNA und Spleißosom entstehen kann.

Das SR-Protein Srp2 (SRSF4/5/6) dagegen befindet sich nicht am Spleißosom, sondern bindet an Exonsequenzen und interagiert dort mit spleißosomalen Proteinen (Abbildung 47, S. 70). Ein bekannter Interaktionspartner in *S. pombe* ist Uaf2 (hsU2AF1), welches beim Aufbau des

E-Komplexes an die 3'-SS bindet (Webb et al, 2005; Webb & Wise, 2004). Die Interaktion von hsU2AF1 (spUaf2) mit SR-Proteinen ist auch in Mammalia konserviert (Wang et al, 1995; Wu & Maniatis, 1993). In Mammalia wird auch die Bindung des U1 snRNPs an die Exon1/5'-SS durch SR-Proteine beeinflusst. Sowohl das SR-Protein hsASF/SF2 als auch das SR-ähnliche U1 Protein hsU1-70K (spUsp101/scSNP1) werden in Mammalia phosphoryliert, was zu einer Interaktion der beiden Proteine führt. Diese Interaktion reguliert die Bindung des U1 snRNPs am 5'-Ende des Introns (Cho et al, 2011). Beide Proteine werden in Mammalia von PRPF4B (spPrp4) phosphoryliert (Bennett et al, 2004; Gao et al, 2013). Bisher ist in *S. pombe* kein Interaktionspartner von Srp2 bekannt, der bei der Erkennung der Exon1/5'-SS eine Rolle spielen könnte. Trotzdem wäre es vorstellbar, dass die Phosphorylierung von Srp2 durch die Prp4 Kinase die Interaktion mit weiteren spleißosomalen Proteinen ermöglicht und dadurch die Erkennung von schwachen Spleißstellen verbessert (Abbildung 47, S. 70)

A) Ohne Inhibition der Kinase



B) Nach Inhibition der Kinase

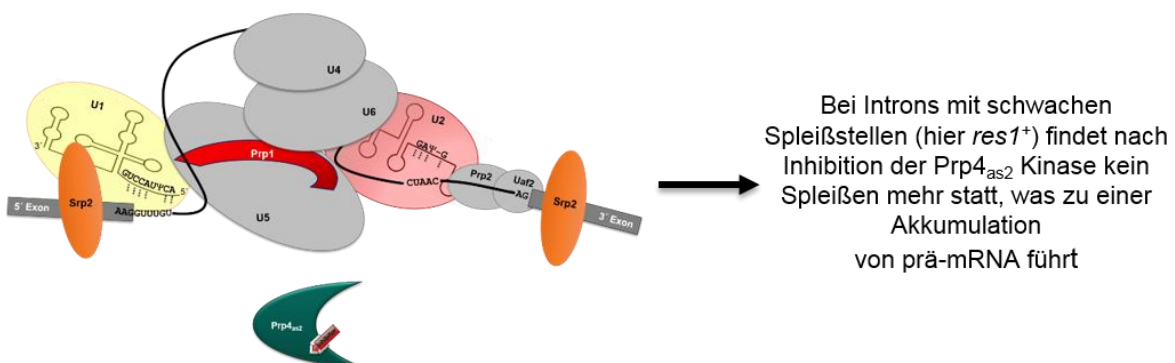


Abbildung 47| Hypothetisches Model zur Rolle der Prp4 Kinase bei der Intronerkennung

A) Ohne Inhibition der Prp4_{as2} Kinase können Prp1 und Srp2 phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von Prp1 könnte die Konformation des Proteins verändern, so dass die Basenpaarung von snRNAs und Spleißstellen begünstigt wird. Die Phosphorylierung von Srp2 könnte zur Interaktion des Proteins mit weiteren spleißosomalen Proteinen führen, die die Bindung des Spleißosoms stabilisieren. Am 3' Ende des Introns bindet Srp2 an Uaf2. Ob Srp2 auch am Anfang des Introns eine Bindung mit einem spleißosomalen Protein eingehen kann ist bisher nicht bekannt. B) Nach Inhibition der Kinase findet keine Stabilisierung des Spleißosoms an der prä-mRNA mehr statt, so dass bei Introns die schwache Spleißstellen besitzen prä-mRNA akkumuliert.

5 Ausblick

Das dargestellte Modell wirft viele neue Fragen auf, die zukünftig experimentell untersucht werden können. Nachdem gezeigt wurde, welche Folgen die Inhibition der Kinase für den Spleißprozess hat, muss jetzt untersucht werden, welche Funktion die beiden Substrate Prp1 und Srp2 bei diesem Regulationsmechanismus haben und ob dies die einzigen Substrate der Kinase sind. Dazu könnte zuerst betrachtet werden, welche Auswirkung ein Fehlen der beiden Proteine für den Spleißprozess hat. Da beide Gene essentiell sind, wodurch eine Deletion nicht möglich ist, könnten Stämme hergestellt werden, bei denen Prp1 oder Srp2 über einen reprimierbaren Promotor ausgeschaltet werden. Im Anschluss kann mittels RT-PCR der Einfluss auf die Spleißeffizienz ohne und mit Inhibition der Kinase untersucht werden. Da viele Prozesse in der Zelle durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden, wäre es auch von Interesse zu untersuchen, welche Folgen eine Dauerphosphorylierung von Prp1 hat. Dazu können die Aminosäurereste, die als Phosphorylierungsstellen bekannt sind, einzeln oder insgesamt zu Glutamat mutiert werden, was eine Phosphorylierung des Proteins vortäuscht. Im Anschluss kann über RT-PCR untersucht werden, ob das Spleißen davon beeinträchtigt wird. Um die Funktion von Srp2 bei der Intronerkenennung in *S. pombe* weiter aufzuklären, könnte mittels Co-Immunopräzipitation nach Interaktionspartnern von Srp2 gesucht werden. Dabei könnten Proteine des U1 snRNPs in Betracht kommen, die am Intronanfang an die prä-mRNA binden. Weiterhin ist noch zu klären, ob Srp2 auch *in vivo* ein Substrat der Prp4 Kinase ist und ob außer Prp1 weitere *in vivo* Substrate von Prp4 in der Hefe existieren, die am Spleißprozess beteiligt sind. Dazu könnte ohne und mit Inhibition der Prp4 Kinase eine Phosphoproteomanalyse durchgeführt und durch den Vergleich der beiden Ergebnisse weitere Substrate identifiziert werden.

IV Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Tabelle 1| Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
1NM-PP1	Toronto Research Company	A603003
Adenin	Applchem	A0939
ATP	Roth	K054.2
Agar	Serva	11396.04
Ammoniumchlorid	Roth	K298.2
Ampicillin	Applchem	A0839
Bacto Malt Extrakt	Merck	105391
Bacto™ Yeast Extract	BD	212750
Borsäure	Roth	6943.3
CaCl ₂	Merck	2382
Calcofluor White	Sigma	F6259
Chloramphenicol	Roth	3886.2
Chloroform	Roth	3313.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Merck	2790
DAPI	Roth	6335.1
d-Biotin	Sigma	B4501
DEPC	Roth	T143.3
di-Natriumhydrogenphosphat dihydrat	Roth	4984.1
DMSO	Roth	A994.1
dNTPs	Roth	K039.1
EDTA	Roth	8043.2
Essigsäure	Roth	3738.2
Ethanol	Chemikalienlager TU BS	64-17-5
Ethidiumbromid	Biomol	54542
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Merck	3943
Glasperlen 0,5 mm	Roth	N030.1

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
Glukose	Roth	6780
Glycerin	Roth	3783.2
HCl	Roth	A0659
Inositol	Roth	6329.1
IPTG	Applichem	A4773
Isopropanol	Roth	6752.4
Kaliumacetat	Roth	4986.1
Kaliumhydrogenphthalat	Roth	P750.2
Geneticindisulfat G418	Roth	0239.4
KCl	Roth	6781.1
KH ₂ PO ₄	Roth	3904.1
KJ	Merck	5043
KOAc	Roth	4986.1
Spermidin	Roth	716.1
L-Histidin	Roth	3852.3
Lithiumacetat	Roth	5447.1
Lithiumchlorid	Sigma	L-9650
L-Leucin	Applichem	A3460
L-Lysin	Merck	105.700
L-Tryptophan	Merck	8375
Lysozym	Biomol	MB-109-1000
Magnesiumchlorid	Roth	2189.1
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Applichem	A2087
MgSO ₄	Sigma	M1880
MnSO ₄	Merck	5963
Molybdän(VI)-säure	Merck	403
MOPS	Serva	29836
Na ₂ HPO ₄	Roth	4984.1
Na ₂ SO ₄	Sigma	S-9627
NaCl	Roth	3957.2
NaOH	Roth	P031.1

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Chemikalien	Hersteller	Artikelnummer
Natriumacetat	Roth	6771.1
Natriumcitrat	Merck	6268
ClonNAT (Nurseothricin)	Werner	
Nikotinsäure	Roth	3815.1
Pantothensäure	Merck	2316
PEG 3350	Sigma	P3640
PEG 4000	Roth	0156.1
Phenol/Chloroform (PCIA)	Roth	A156.2
Propidiumiodid	Sigma	P4170
RNAse A	Thermo Scientific	EN0531
Rubidiumchlorid	Applchem	A4240
Saccharose	Roth	9097.1
SDS	Biorad	161-0416
ssDNA	Sigma	D1626
Tetracyclin	Sigma	T7660
Tris	Roth	4855.3
Triton X-100	Roth	3051.3
Trypton/Pepton aus Casein	Roth	8952.2
Uracil	Roth	7288.3
X-GAL	Applchem	A1007
Yeast Nitrogen Base	Difco	291940
Zitronensäure	Roth	1818.1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	8883

1.2 Geräte, Zentrifugen und Rotoren

Tabelle 2| Geräte, Zentrifugen und Rotoren

Geräte / Zentrifugen und Rotoren	Hersteller
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad
Gelkammer für Agarosegele Horizon 58	Gibco BRL
Kühlzentrifuge Fresco	Heraeus
Megafuge 1.0	Heraeus

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Geräte / Zentrifugen und Rotoren	Hersteller
Mikromanipulator	Singer Instruments
Mikroskop Axiophot 2	Zeiss
Precellys 24	Peqlab
Sorvall RC5C Rotoren: HB-4, GS-3, SS34	Dupont
Speed Vac Plus SC110A	Savant
Spektralphotometer DU 530	Beckman
Thermocycler Mastercycler personal	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Tischzentrifuge Pico	Heraeus

2 Stämme und Kulturbedingungen

2.1 Stämme und Medien der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. pombe* Stämme sind in Tabelle 3 aufgelistet und von den von Leupold beschriebenen Stämmen abgeleitet (Leupold, 1950). Die Stämme wurden entweder der Stammsammlung des Instituts für Genetik der TU Braunschweig entnommen oder im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die in dieser Arbeit hergestellten Stämme sind mit einem „*“ gekennzeichnet. Paarungstyp, Genotyp und Herkunft sind angegeben.

Tabelle 3| *S. pombe* Stämme

Nr.	Paarungs- und Genotyp	Herkunft
L972	h^{-S}	
L975	h^{-N}	
747	$h^{-S} prp1 \text{ int}::\text{myc-prp1-127}^{\text{ts}}\text{-kan}^R$	S. Zock- Emmenthal
*796	$h^{-S} prp4 \text{ int}::prp4^{+}\text{-kan}^R$	
*801	$h^{-S} prp4 \text{ int}::prp4\text{-as2-kan}^R$	
*812	$h^{-S} prp4 \text{ int}::prp4\text{-as2-kan}^R \text{ leu1-32 ura4-D18}$	
*930	$h^{-S} prp4 \text{ int}::prp4\text{-as2-kan}^R \text{ leu1-32 ura4-D18 int}::\text{ura4+res1-Intron (127 bp)}$	
*933	$h^{-S} prp4 \text{ int}::prp4\text{-as2-kan}^R \text{ leu1-32 ura4-D18 int}::\text{ura4+ade2-II-Intron (383 bp)}$	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Nr.	Paarungs- und Genotyp	Herkunft
*971	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-7</i>	
*972	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-2</i>	
*973	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-1</i>	
*991	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-WT</i>	
992	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-A</i>	S. Pötter
993	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-B</i>	S. Pötter
995	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-E</i>	S. Pötter
*996	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-C</i>	
*997	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-D</i>	
998	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-7A</i>	S. Pötter
999	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-7C</i>	S. Pötter
1000	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-7D</i>	S. Pötter
1001	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-7E</i>	S. Pötter
*1006	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-7B</i>	
1017	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-11</i>	S. Plath
1018	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-15</i>	S. Plath
1019	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-18</i>	S. Plath
1020	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-19</i>	S. Plath
1021	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-21</i>	S. Plath
1022	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-14</i>	S. Plath
1023	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-13</i>	S. Plath
1024	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-12</i>	S. Plath
1025	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-17</i>	S. Plath
1026	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-16</i>	S. Plath
1028	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-20</i>	S. Plath
1029	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-8</i>	S. Plath
1030	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-9</i>	S. Plath
1031	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-10</i>	S. Plath
1032	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-5</i>	S. Plath
1033	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-6</i>	S. Plath

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Nr.	Paarungs- und Genotyp	Hergestellt
1034	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-WT</i>	S. Plath
1037	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-5</i>	S. Plath
1038	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-6</i>	S. Plath
1039	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-1</i>	S. Plath
1040	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-2</i>	S. Plath
1041	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-3</i>	S. Plath
1042	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-4</i>	S. Plath
*1048	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-3</i>	
*1049	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-res1'-4</i>	
*1050	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-10</i>	
*1051	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-7</i>	
*1052	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-8</i>	
*1053	<i>h^S prp4 int::prp4-as2-kan^R ura4-D18 leu1-32 int ::pML81HA-ppk8'-9</i>	

Zur Kultivierung von *S. pombe* wurden die folgenden Medien verwendet (Tabelle 4), deren Zusammensetzung von Egel (1971), Gutz H et al (1974) und Moreno et al (1991) beschrieben wurde. Bei YE und EMM wurden bei Bedarf 75 mg/L Adenin, 100 mg/L L-Histidin, 150mg/L L-Leucin, 50 mg/L Lysin oder 100 mg/L Uracil zugegeben. Zur Selektion durch Antibiotika wurde 150 mg/L Geneticin (kan^R) oder 100 mg/L Nurseotricin (nat^R) verwendet.

Tabelle 4| *S. pombe* Medien und Lösungen

Medien und Lösungen	Zusammensetzung
Edinburgh Minimal Medium (EMM)	2 % (w/v) Glukose 14,7 mM Kaliumhydrogenphthalat 15,5 mM Na ₂ HPO ₄ 93,5 mM NH ₄ Cl 20 mL Salzlösung (Stock x 50) 1 mL A1 (Stock x 1000) 1 mL A3a (nach dem autoklavieren, Stock x 1000) 1 mL A3b (nach dem autoklavieren, Stock x 1000)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Medien und Lösungen	Zusammensetzung
Yeast Extrakt (YE)	3 % (w/v) Glukose 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
Malz Extrakt (ME)	3 % (w/v) Bacto Malt Extrakt
Sporulations Medium (SPA)	1 % (w/v) Glukose 7,3 mM KH_2PO_4 (gelöst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) 1 mL A3a (nach dem autoklavieren, Stock x 1000) 1 mL A3b (nach dem autoklavieren, Stock x 1000)
50 x Salzlösung	0,26 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4,99 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,67 M KCl 14,1 mM Na_2SO_4
1000 x Minerallösung A1	80,9 mM Borsäure 23,7 mM MnSO_4 13,9 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,40 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,47 mM Molybdän(VI)-säure 6,02 mM KJ 1,60 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 47,6 mM Zitronensäure
1000 x Vitaminlösung A3a	4,20 mM Pantothensäure 81,2 mM Nikotinsäure 55,5 mM Inositol
1000 x Vitaminlösung A3b	40,8 μM d-Biotin (gelöst in 50 % EtOH)

2.2 Stämme und Medien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Der in Tabelle 5 beschriebene *S. cerevisiae* Stamm wurde in dieser Arbeit zur Durchführung des Yeast Recombinational Cloning verwendet.

Tabelle 5| Verwendeter *S. cerevisiae* Stamm

Stammnummer	Genotyp
FY834	<i>Mata his3Δ200 ura3–52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63</i>

Die Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae* sind in Tabelle 6 aufgelistet. Bei Bedarf wurden dem Synthetisch definierten (SD) Medium folgende Aminosäuren zugesetzt: 20 mg/L L-Tryptophan, 20 mg/L L-Histidin-HCl, 30 mg/L L-Leucin, 30 mg/L L-Lysin-HCl und 20 mg/L L-Uracil. 2 % (w/v) Agar wurden für Festmedium eingesetzt.

Tabelle 6| *S. cerevisiae* Medien

Medien	Zusammensetzung
Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Pepton 2 % (w/v) Glukose
Synthetic Defined (SD)	0,76 % (w/v) Yeast Nitrogen Base 3 % (w/v) Glukose

2.3 Stämme und Medien für *Escherichia coli*

Folgende *E. coli* Stämme wurden in dieser Arbeit zur Vermehrung von Plasmid- DNA, *Pfu*- oder M13-Mutagenese verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7| *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp
XL1-Blue MRF ⁺	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^r\text{)]}$
DH5 α^{TM}	$\text{F}^- \text{ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG } \Phi 80\text{d} \text{ lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169, hsdR17(rK}^- \text{ mK}^+), \lambda^-$
CJ236	$\text{F}\Delta(\text{HindIII})::\text{cat (Tra}^+ \text{ Pil}^+ \text{ Cam}^R\text{)}/ \text{ ung-1 relA1 dut-1 thi-1 spoT1 mcrA fhuA2 [lon] ompT gal } (\lambda \text{ DE3) [dcm] } \Delta\text{hsdS}$

Die hier verwendeten *E. coli* Stämme wurden in sterilem flüssigen LB Medium (Tabelle 8) oder auf Agarplatten (2 % (w/v) Agar) über Nacht aerob bei 37 °C angezogen (Sambrook, 2001). Bei Bedarf wurden folgende Antibiotika hinzugesetzt (Tabelle 9). Bei der *in vitro* Mutagenese nach Kunkel wurden außerdem dYT-Medium, M13-Agarplatten und Top-Agar verwendet.

Tabelle 8| *E. coli* Medien

Medien	Zusammensetzung
Lysogeny broth (LB)	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton/Pepton 1 % (w/v) NaCl
dYT-Medium	1 % (w/v) Hefeextrakt 1,6 % (w/v) Trypton/Pepton 0,5 % (w/v) NaCl
M13-Agarplatten	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,8 % (w/v) Trypton/Pepton 0,5 % (w/v) NaCl 1,2 % (w/v) Agar
Top-Agar	1 % (w/v) Trypton/Pepton 0,5 % (w/v) NaCl 0,7 % (w/v) Agar 0,5 mM MgSO ₄

Tabelle 9| Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/mL in H ₂ O	60 µg/mL
Tetracyclin	12,5 mg/mL in EtOH	25 µg/mL
Chloramphenicol	34 mg/mL in EtOH	34 µg/mL

3 Vektoren und Konstrukte

Die in Tabelle 10 aufgeführten Vektoren wurden zur Herstellung aller Konstrukte verwendet.

Tabelle 10| Vektoren

Vektor	Hersteller
M13mp18/19	Boehringer
pGEX-6p-1	Amersham
pUC18/19	University of California (UC)
pRS426	ATCC
pML81HA	Martin Lützelberger, TU Braunschweig

3.1 Konstruktion der analog-sensitiven Prp4 Kinase

Um die „Gate-Keeper“ Aminosäure der Prp4 Kinase zu mutieren, so dass die analog-sensitive Prp4_{as2} Kinase entsteht, wurde eine *Pfu*-Mutagenese durchgeführt. Dazu wurde der Vektor pGEX-6p-1 verwendet, in dessen Polylinker die cDNA des Gens *prp4*⁺ (Genbank acc. No. L10739) über die *Bam*HI Schnittstelle kloniert worden ist (Plasmidsammlung AG Käufer, TU Braunschweig) (Abbildung 48A). Durch *Pfu*-Mutagenese wurde die „Gate-Keeper“ Aminosäure, ein Phenylalanin an Position 238, in ein Alanin mutiert. Um die positiven Klone nach der Mutagenese identifizieren zu können, wurde eine zusätzliche *Hind*III Restriktionsschnittstelle eingefügt, die die Aminosäuresequenz des *prp4* Gens nicht zusätzlich verändert. Anschließend wurde über das „Yeast Recombinational Cloning“ ein *prp4-as2* Konstrukt erstellt. Dieses besteht aus dem mutierten *prp4*-Gen und zusätzlich homologen Bereichen, wie dem Terminationsbereich und einem 3′-flankierenden Bereich des *prp4*-Gens, die zur Integration des Konstrukts in den Wildtyp-Lokus benötigt werden. Zur Selektion wurde eine Resistenzkassette zwischen dem Terminationsbereich und der 3′-flankierenden Sequenz eingefügt, die eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Diese einzelnen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und in dem Vektor pRS426 miteinander kombiniert (Abbildung 48B). Das vollständige Konstrukt wurde abschließend durch eine PCR (YRC_PRO-Prp4_F & YRC_Fla_Prp4_R) amplifiziert, in die Hefe transformiert und dabei über homologe Rekombination in den Wildtyp *prp4*⁺ Lokus integriert. Der dabei entstandene Stamm 801 besitzt folgenden Genotyp *h^s prp4 int::prp4-as2-kan^R*. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgeführt.

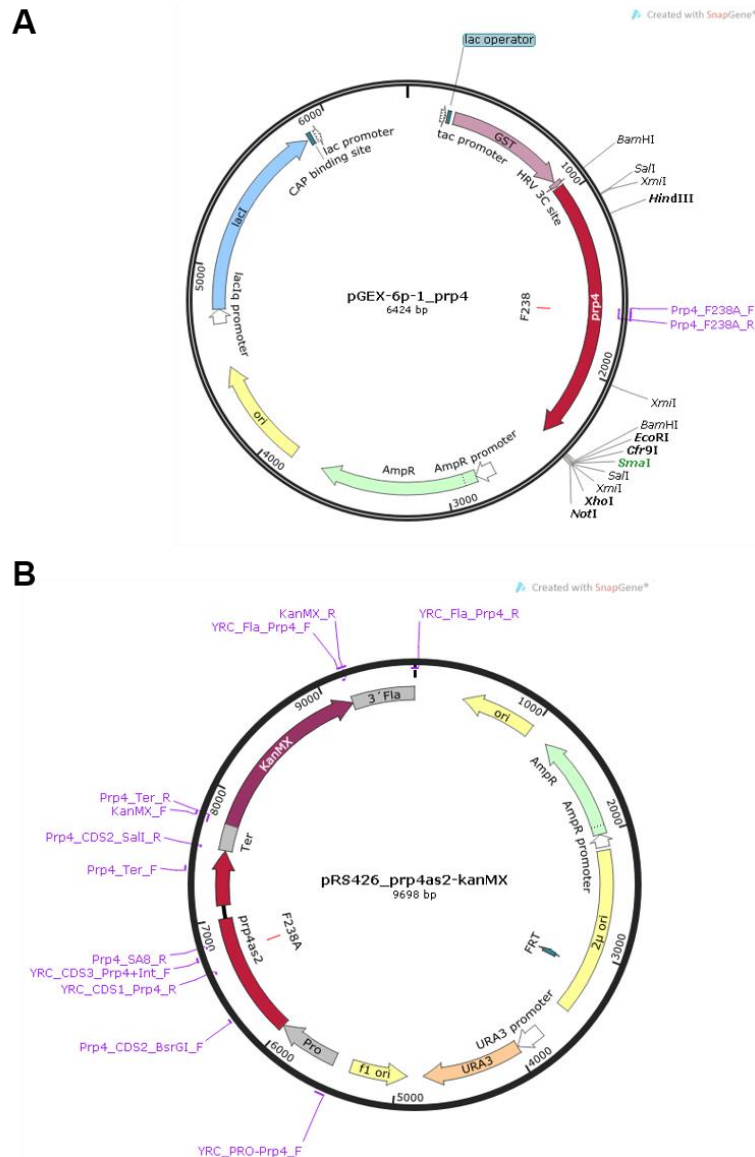


Abbildung 48| Konstruktion des analog-sensitiven Allels der *prp4-as2* Kinase

(A) Vektorkarte des pGEX- ϕ -1 mit enthaltener cDNA des *prp4* Gens; AmpR, Ampicillin-Resistenzgen; ori, Replikationsursprung; *lacI^q*, Gen für den *lac*-Repressor (B) Vektorkarte des pRS426, in dem sich das vollständige *prp4-as2* Konstrukt befindet; ori, Replikationsursprung; AmpR, Ampicillin-Resistenzgen; *ura3*, Gen für Orotidine-5'-phosphate (OMP) Decarboxylase aus *S. cerevisiae*

Tabelle 11| Primer zur Konstruktion der analog-sensitiven Kinase

Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen; Mutationen sind dick gedruckt und mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
Prp4_CDS_BamHI_F	ATATAT <u>GGATCC</u> ATG AGTGACGATAGATTTGCAGAAGAT
Prp4_CDS_BamHI_R	TATATAT <u>GGATCC</u> TTA TTTTTTTATAAAGAAAGGATGCTTCAAAGC

Fortsetzung auf nächster Seite

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
Prp4_F238A_F	AATCATCTTTGCATGGTG gc TGAGATGTT <u>AAGCTT</u> AAATCTTCGGGACATTTTG
Prp4_F238A_R	CAAAATGTCCCGAAGATTT <u>AAGCTT</u> AACATCTCA gc CACCATGCAAAGATGATT
YRC_PRO-Prp4_F	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGATGTATCGGTAATTGATTCTCTTAAAAATC
YRC_CDS1-Prp4_R	TGCAGTCGCTCAAGAATTGATACTT
Prp4_CDS2_BsrGI_F	ATTCCCCCTCTATCAAATCTT
Prp4_SA8_R	GCCATGAACATTTGATAG
YRC_CDS3-Prp4+Int_F	TCGGGACATTTTGAAAAAATTTGG
Prp4_CDS2_SalI_R	ATGAACCCGCAGTTTATTTTT
Prp4_Ter_F	TAAGCCGACCAAAGACATTCGATCTC
Prp4_Ter_R	CGGCGGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTAACACTATTTACTGGAGAAAGAAAATTG
KanMX_F	AGATCTGTTTAGCTTGCCCTCGTCCC
KanMX_R	GTTTAAACTGGATGGCGGCGTTAGT
YRC_Fla-Prp4_F	TCGATACTAACGCCGCCATCCAGTTTAAACTGTGTCGAAAGAGTCTCATACTCGTTC
YRC_Fla-Prp4_R	GCGGATAACAACATGCAGACAGGAAACAGCCCAACAAGTTGTGCCGCCTTTTCCAA

3.2 Integration des *res1*- und *ade2-II*-Introns in das intronlose *ura4*-Gen

Sowohl das Prp4-abhängig gespleißte Intron des *res1* Gens (127 bp), als auch das Prp4-unabhängig gespleißte große Intron II des *ade2* Gens (383 bp) sollten in das ursprünglich intronlose *ura4*-Gen eingefügt werden. Dazu wurde die kodierende Sequenz des *ura4*-Gens einschließlich Promotor- und Terminationssequenz in den pUC18 Vektor kloniert. Beide Introns wurden jeweils über die *StuI* Restriktionsschnittstelle eingefügt, die sich in der Mitte des *ura4*-Gens befindet (Abbildung 49). Anschließend wurden die vollständigen Konstrukte durch PCR (*ura4*_BamHI_F & *ura4*_PstI_R) amplifiziert, in den Stamm 812 transformiert und über homologe Rekombination in den *ura4*-Lokus der Hefe integriert. Dabei sind die Stämme 930 und 933 entstanden (Tabelle 3). Die Primer sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12| *ura4*-Primer

Restriktionsschnittstellen sind kursiv und unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
<i>ura4</i> _BamHI_F	CGGGAT <u>CCCT</u> TATATGTATGCATTTGTG
<i>ura4</i> _PstI_R	TACTGCA <u>GTGT</u> GATTGGAGCAATTTTAAAC
<i>ade2</i> _genomic:181F31	GTATGTTACAAAAGCTTTATATAGTGGTGAA
<i>ade2</i> _genomic:521R43	CTAAAAATAAAAGTTAGCTATATATTTGAAAAATCAATACAAG

Fortsetzung auf nächster Seite

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
res1_Intron-cloning_F	GTTTGTGTTAACTTCTTACTATATCAATAGGTTTAAACT
res1_Intron-cloning_R	CTGAATGAATAGTTAGTAACAGGCATCCAA
ura4_RT-PCR_M1_F	CTTGGGCTCATATCACAAATTGCC
ura4_RT-PCR_M1_R	CAGCCCGTCTCCTTTAACATCC

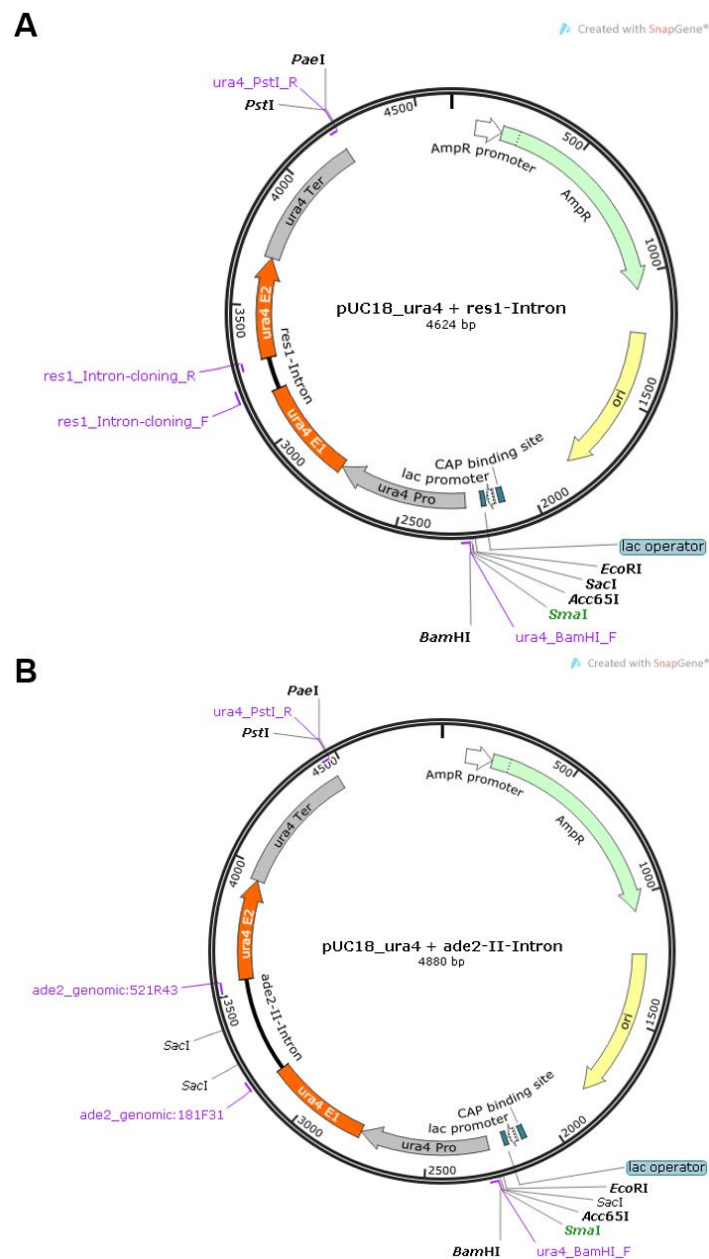


Abbildung 49| Integration des *res1* und *ade2-II* Introns in das *ura4* Gen

Vektorkarte des pUC18, der über die Restriktionsschnittstelle *Bam*HI das *ura4* Gen enthält. Das Fragment des (A) *res1*-Introns und des (B) *ade2-II*-Introns wurde über *Stu*I eingefügt. AmpR, Ampicillin-Resistenzgen; ori, Replikationsursprung

3.3 Konstruktion der Reportergene *res1'* und *ppk8'*

Um zu untersuchen welche Folgen Mutationen im Bereich des Exon1 und der 5'-SS sowie in der BS des Prp4-abhängigen *res1*-Introns und des Prp4-unabhängigen *ppk8*-Introns haben, wurden zwei Reportergene konstruiert. Dazu wurden beide Gene für die Mutagenese in den pUC19 bzw. M13mp18 Vektor kloniert. Nach erfolgreicher Mutagenese wurden sie in den Vektor pML81HA subkloniert und darüber in den *leu1*-Lokus der Hefe integriert. Ein Teil der *res1'* und *ppk8'* Konstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Verlauf der Masterarbeit von Susann Plath (2015) und Sebastian Pötter (2014) entstanden (Tabelle 3, S.75).

3.3.1 Der Vektor pML81HA

Der pML81HA (Martin Lützelberger, TU Braunschweig) ist ein Integrationsvektor für *S. pombe*, der es ermöglicht Gene in den *leu1*-Lokus zu integrieren. Dazu besitzt der Vektor das *leu1⁺* Gen, sowie den *nmt1-8* Promotor und *nmt1* Terminator aus *S. pombe*. Der *nmt1-8* Promotor ist aus dem Promotor des *nmt1* Gens entstanden, bei welchem nachträglich sieben Nukleotide der TATA Box deletiert wurden, so dass sich die Transkriptionsrate auf ca. 1 % der des Wildtyp *nmt1⁺* Promotors reduziert (Basi et al, 1993). Der *nmt1* Promotor kann durch Zugabe von 200 µM Thiamin reprimiert werden. Zur Verwendung in *E. coli* besitzt der Vektor einen Replikationsursprung (*ori*) und ein Ampicillin Resistenzgen (*ampR*).

3.3.2 Mutagenese und Konstruktion des *res1'*-Reportergens

Um die Spleißstellen des *res1'*-Gens durch *Pfu*- bzw. M13-Mutagenese zu verändern, wurde das *res1*-Gen mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I sowohl in den pUC19 Vektor, als auch in den M13mp18 Vektor kloniert. Während der Mutagenese wurde bei allen Exon1/5'-SS Mutationen zeitgleich eine zusätzliche *Hind*III Schnittstelle im Exon1 erzeugt und bei allen Mutationen der BS eine *Pvu*I-Schnittstelle im Exon2. Über diese beiden Schnittstellen konnten die positiven Klone identifiziert werden. Die dazu verwendeten Primer sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13| *res1'* Primer

Die Schnittstellen sind kursiv und unterstrichen und die eingefügten Mutationen der Spleißstellen sind in Kleinbuchstaben dick gedruckt hervorgehoben.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
res1_CDS_BamHI_F	TAAATT <u>GGATCC</u> CAATAGTGCCGTTATGTATA
res1_CDS_SalI_R	GAATGCAAAAAATAAGAT <u>GTCGAC</u> AGAAAAAA
OL82	GCTCCAGGATACTTGTATATTTTCGTTAAA
OL83	CGTTTACAATTTCTGATGCGGT

Fortsetzung auf nächster Seite

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
res1_HindIII_F	GTGGTTGTGGAAGCTTTCAAGGTTG
res1_HindIII_R	CAAACCTTGAAAGCTTCCACAACCAC
res1_Mut1_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACACAAAgCTTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut2_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACACAAtCCTTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut3_F	GTGGTTGTGGAAGCTTTCAAGCTaaGTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut3_R	GTAAGAAGTTAACACttAgCTTGAAAGCTTCCACAACCAC
res1_Mut4_F	GTGGTTGTGGAAGCTTTCAAGGaaaGTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut4_R	GTAAGAAGTTAACACtttCCTTGAAAGCTTCCACAACCAC
res1_Mut5_F	GTGGTTGTGGAAGCTTTCAAGGTaTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut5_R	GTAAGAAGTTAACACAAtACCTTGAAAGCTTCCACAACCAC
res1_Mut6_F	GTGGTTGTGGAAGCTTTCAAGGTaGTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut6_R	GTAAGAAGTTAACACtAACCTTGAAAGCTTCCACAACCAC
res1_Mut7_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACACttACCTTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut8_F	GTGGTTGTGGAAGCTTTCAAGGtaactGTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut8_R	GTAAGAAGTTAACAgttACCTTGAAAGCTTCCACAACCAC
res1_Mut9_F	GTGGTTGTGGAAGCTTTCAAGGTaaaGTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut9_R	GTAAGAAGTTAACAttACCTTGAAAGCTTCCACAACCAC
res1_Mut10_F	GTGGTTGTGGAAGCTTTCAAGGtaatGTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut10_R	GTAAGAAGTTAACAttACCTTGAAAGCTTCCACAACCAC
res1_Mut11_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACAgAAACCTTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut12_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACTttACCTTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut13_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACgcttACCTTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut14_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACccttACCTTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut15_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACTCAAACCTTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut16_F	GGTGGTTGTGGAAGCTTTCAGGTaaGTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut16_R	GTAAGAAGTTAACACttACCTgGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut17_F	GGTGGTTGTGGAAGCTTTCtagGTaaGTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut17_R	GTAAGAAGTTAACACttACCTaGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut18_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACACttACgTTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut19_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACACttACCaTGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut20_F	GGTGGTTGTGGAAGCTTTCttcGTaaGTGTTAACTTCTTAC
res1_Mut20_R	GTAAGAAGTTAACACttACAagGAAGCTTCCACAACCACC
res1_Mut21_R	Pho-CCTATTGATATAGTAAGAAGTTAACACttACgATGAAAGCTTCCACAACCACC
res1_CTAtC_pvuI_F	GCCTGTTACTAtCTATTCATTCAGGAAGTTGGGTACCCTC <u>CGATCG</u> AGCTGTTG
res1_CTAtC_pvuI_R	CAACAGCT <u>CGATCG</u> AGGGTACCCAAGTTCCTGAATGAATAGaTAGTAACAGGC
res1_CtAC_pvuI_F	GCCTGTTACTtACTATTCATTCAGGAAGTTGGGTACCCTC <u>CGATCG</u> AGCTGTTG
res1_CtAC_pvuI_R	CAACAGCT <u>CGATCG</u> AGGGTACCCAAGTTCCTGAATGAATAGTaAGTAACAGGC

Fortsetzung auf nächster Seite

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
res1_gTAAC_pvuI_F	GCCTGTTAG ^g TAACATTCATTCAGGAACCTGGGTACCCTCCGATCGAGCTGTTG
res1_gTAAC_pvuI_R	CAACAGCTCGATCGAGGGTACCCAAGTTCCTGAATGAATAGTTA ^c TAACAGGC
res1_CgAAC_pvuI_F	GCCTGTTAC ^g AACTATTCATTCAGGAACCTGGGTACCCTCCGATCGAGCTGTTG
res1_CgAAC_pvuI_R	CAACAGCTCGATCGAGGGTACCCAAGTTCCTGAATGAATAGTT ^c GTAACAGGC
res1_WT_RT-PCR_F	GGGACTTCATGAAAAAATTCAAGGTGG
res1_Mut_RT-PCR_F	GAAAAAATTCAAGGTGGTTGTGGAAGC
res1_RT-PCR_E2_R	AAGGCCGGGAAATGACTTTTT

Nach erfolgreicher Mutagenese wurde das *res1*⁻-Gen über PCR amplifiziert und anschließend über *Bam*HI und *Sal*I in den pML81HA subkloniert. Dabei ist zwischen HA-Tag des Vektors und ATG des *res1*⁻-Gens eine Leserasterverschiebung erzeugt worden, die dazu führt, dass zwar ein stabiles *res1*⁻ Transkript entsteht, aber kein funktionsfähiges Res1 Protein gebildet werden kann, welches die Hefezelle beeinflussen könnte. Der Vektor wurde anschließend mit *Bsi*WI linearisiert und über homologe Rekombination in den *leu1*-Lokus integriert.

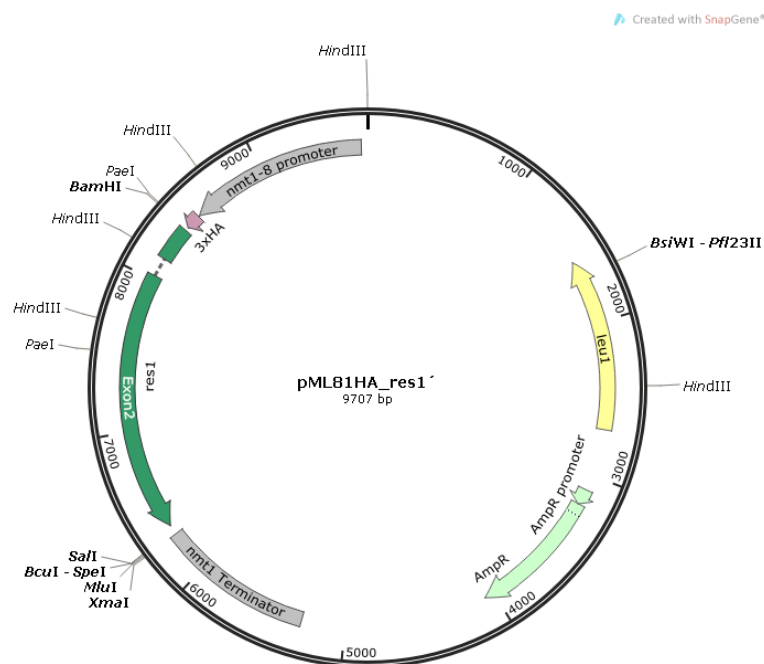


Abbildung 50| Der Integrationsvektor pML81HA_res1'

Vektorkarte des pML81HA_res1'. Das *res1*⁻-Gen wurde über *Bam*HI und *Sal*I in den Vektor kloniert; *nmt1*-8 Promotor und *nmt1* Terminationssequenz; 3xHA, HA-tag AmpR, Ampicillin-Resistenzgen; *leu1*⁺ aus *S. pombe*

Um während der RT-PCR zwischen dem *res1*⁺ und dem *res1*⁻ im *leu1*-Lokus zu unterscheiden, wurde der in der RT-PCR verwendete Vorwärts-Primer (res1-Mut_F) so gewählt, dass er direkt

in dem mutierten Nukleotid endet, dass für die Erzeugung der *HindIII* Schnittstelle genutzt wurde. Da die *Tth*-Polymerase, die für die Reverse Transkription und anschließende Amplifikation der Fragmente verwendet wurde, keine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt, kann diese den Strang nur verlängern, wenn das letzte Nukleotid am 3'-Ende des Primers mit der Sequenz des Templates übereinstimmt. Um das *res1* im Originallokus zu untersuchen, wurde ein Primer (*res1*-WT_F) verwendet. Der verwendete Rückwärts-Primer im Exon 2 (*res1*-R) ist für beide Transkripte identisch.

3.3.3 Mutagenese und Konstruktion des *ppk8'*-Reportergens

Die Strategie die zur Klonierung, Mutagenese und Integration des Reporter-Transkripts *ppk8'* verwendet wurde, entspricht der des *res1'*. Der einzige Unterschied besteht darin, dass bei *ppk8'* zur Klonierung die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Mlu*I verwendet wurden. Es wurde ebenfalls eine zusätzliche *Hind*III Schnittstelle im Exon1 eingefügt, wie auch eine Leserasterverschiebung, die im Exon2 zu einem Stopp-Codon führt, so dass kein funktionsfähiges Ppk8 Protein entstehen kann. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 14 aufgelistet.

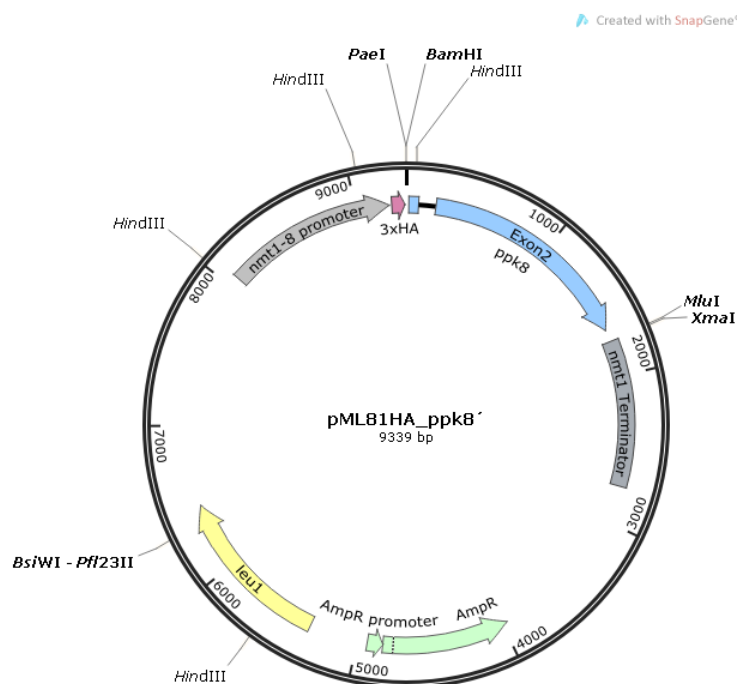


Abbildung 51| pML81HA_ *ppk8'*

Vektorkarte des pML81HA_ *ppk8'*. Das *ppk8* Gen wurde über *Bam*HI und *Mlu*I in den Vektor kloniert; *nmt1*-8 Promotor und *nmt1* Terminationssequenz; 3xHA, HA-tag; AmpR, Ampicillin-Resistenzgen; *leu1*⁺ aus *S. pombe*

Tabelle 14| *ppk8*′ Primer

Die Schnittstellen sind kursiv und unterstrichen und die eingefügten Mutationen der Spleißstellen sind in Kleinbuchstaben dick gedruckt hervorgehoben.

Bezeichnung	Sequenz 5′-3′
ppk8_BamHI_F	GAAGCTTTTAC <u>GGATCCA</u> ATTCTTAGAGC
ppk8_MluI_R	GCGATCATTAA <u>ACGCGT</u> CTTCATAATCC
ppk8_Mut_Hind_F	ATTTTGCAA <u>AAGCTT</u> CATTGGAATTAACCTCGGTATGTTTTCTGCC
ppk8_Mut_Hind_R	GGCAGAAAACATACCGAGGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAAT
ppk8_Mut1_F	ATTTTGCAA <u>AAGCTT</u> CATTGGAATTAACCTCG c TATGTTTTCTGCC
ppk8_Mut1_R	GGCAGAAAACATAgCGAGGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAAT
ppk8_Mut2_F	ATTTTGCAA <u>AAGCTT</u> CATTGGAATTAACCTCGGTAT c TTTTCTGCC
ppk8_Mut2_R	GGCAGAAAA g ATACCGAGGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAAT
ppk8_Mut3_F	ATTTTGCAA <u>AAGCTT</u> CATTGGAATTAACCTCGGTATGaTTTCTGCC
ppk8_Mut3_R	GGCAGAAA t CATACCGAGGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAAT
ppk8_Mut4_F	ATTTTGCAA <u>AAGCTT</u> CATTGGAATTAACCTCGGT ta GTTTTCTGCC
ppk8_Mut4_R	GGCAGAAAAC at ACCGAGGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAAT
ppk8_Mut5_F	ATTTTGCAA <u>AAGCTT</u> CATTGGAATTAACCTCGGT t TGTTTTCTGCC
ppk8_Mut5_R	GGCAGAAAACa a ACCGAGGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAAT
ppk8_Mut6_F	ATTTTGCAA <u>AAGCTT</u> CATTGGAATTAACCA ag GT a TGTTTTCTGCC
ppk8_Mut6_R	GGCAGAAAACa t AC ct tGGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAAT
ppk8_M13_Mut7_R	Pho-GGCAGAAAACATACCG t GGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAATAAATTATTAG
ppk8_M13_Mut8_R	Pho-GGCAGAAAACATACG t GGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAATAAATTATTAG
ppk8_M13_Mut9_R	Pho-GGCAGAAAACATAC gg GGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAATAAATTATTAG
ppk8_M13_Mut10_R	Pho-GGCAGAAAACATAC gt GGTTAATTCCAATGA <u>AAGCTT</u> TGCAAAATAAATTATTAG
ppk8_WT_RT-PCR_F	CGGAAGAGAACTCTAATAATTTATTTGCAC
ppk8_Mut_RT-PCR_F	CGGAAGAGAACTCTAATAATTTATTTGCAA
ppk8_RT-PCR_E2_R	CGCTCTCTTCACTCTCAATGG

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die bakterielle Fähigkeit in begrenztem Umfang Fremd-DNA aufzunehmen, kann durch eine chemische Behandlung mit Calciumchlorid oder Rubidiumchlorid gesteigert werden. Um eine möglichst hohe Kompetenz der Bakterien zu erreichen, wurden die kompetenten Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt (Hanahan, 1983). Dazu wurden mit 5 mL einer *E. coli* über Nacht Kultur 500 mL LB-Medium beimpft und bei 37 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,4-0,7 erreicht war. Nun wurden die Zellen durch 10 Min. Zentrifugation bei 4500 UpM und 4 °C geerntet. Das Pellet wird in 150 mL TFB I (10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl₂, 30 mM KOAc pH 5,8, 50 mM MnCl₂, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert, 15 Min. auf Eis inkubiert und erneut 10 Min. mit 4500 UpM bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 mL TFB II (10 mM MOPS pH 7,0, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin) gelöst, in flüssigem Stickstoff in 400 µL Aliquots eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden die kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Danach wurde zu 200 µL kompetenten Zellen die zu transformierende DNA gegeben und 40 Min. auf Eis inkubiert. Der sich anschließende Hitzeschock von 2 Min. bei 42 °C fördert die Aufnahme der DNA. Direkt im Anschluss wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt, 800 µL LB-Medium dazugegeben und 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 Sekunden bei 13.000 UpM abzentrifugiert auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

4.3 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Die Plasmid Minipräparation aus *E. coli* wurde in dieser Arbeit entweder durch die STET-Methode nach Gaterman et al (1988) oder mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey&Nagel durchgeführt. Im Fall einer Midi-Präparation wurde ebenfalls von Macherey&Nagel das Kit NucleoBond® PC100 verwendet. Bei der Verwendung der beiden Kits wurden die Vorgaben des Herstellers eingehalten.

4.4 Plasmid Mini-Präparation nach Gatermann et al

Bei der Plasmid Mini-Präparation wurden 2 mL LB Medium mit Zellen aus einer *E. coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde in einem 2 mL Eppendorfgefäß durch 1 Min. Zentrifugation bei 13.000 UpM pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet im Restmedium durch Vortexen resuspendiert. Zu den gelösten Zellen wurde 110 µL STET-Puffer gegeben (8 % Saccharose (w/v), 5 % Triton X-100 (v/v), 50 mM Tris-HCl pH8,0, 50 mM EDTA, 0,5 mg/mL Lysozym), vorsichtig gemischt und

10 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 Min. im Wasserbad gekocht und die Zelltrümmer 15 Min. bei 13.000 UpM abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Plasmid DNA mit 110 µL Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugation für 10 Min. bei 13.000 UpM wurde die DNA präzipitiert. Um die DNA zu waschen, wurde sie mit 70 % EtOH versetzt und für 5 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in der Speed Vac (Plus SC110A /Savant) getrocknet. Die Plasmid DNA wurde in 30 µL H₂O_{bidest.} gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

4.5 Reinigung und Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Um DNA zu reinigen und Proteine zu entfernen, wurde entweder das DNA Clean & ConcentratorTM -5 Kit der Firma Zymo Research nach Angaben des Herstellers verwendet oder eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt.

Zur Extraktion mit Phenol/Chloroform wurde die wässrige DNA-Lösung mit 1 Volumen PCIA gemischt, gevortext und für 15 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß gegeben, mit 1 Vol. Chloroform versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde nochmals in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 2,5 Vol. 96 % EtOH und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat gefällt. Die Fällung erfolgte für 20 Min. bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C. Die DNA wurde abschließend für 30 Min. bei 4 °C zentrifugiert, mit 70 % EtOH gewaschen und in der Speed Vac getrocknet.

4.6 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wurde in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem UV Spektralphotometer (DU 530/ Beckmann) bestimmt. Es liegt eine Extinktion von 1 vor, wenn sich 50 µg/mL Doppelstrang-DNA bzw. 40 µg/mL Einzelstrang DNA oder RNA in der Lösung befinden.

4.7 Restriktionsverdau

Zur Spaltung doppelsträngiger DNA wurden die Restriktionsenzyme der Hersteller Thermo Scientific und NEB verwendet. Um DNA zu spalten wurde pro µg DNA 1 Std. mit 1 U Enzym geschnitten. Die einzusetzenden Puffer und Restriktionsbedingungen wurden nach Angaben der Hersteller gewählt.

4.8 Ligation

Bei der Ligation werden DNA-Doppelstränge durch die T4-DNA Ligase miteinander verknüpft, wobei ATP als Co-faktor dient. Eine Menge von 20-100 ng des linearisierten Vektors wurde mit dem gewünschten Fragment in einem 20 µl Ansatz, unter Zugabe von PEG 4000 und 1 U der T4-DNA Ligase (Thermo Scientific), miteinander ligiert. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde das Fragment in 3 bzw. 5-fachem molaren Überschuss eingesetzt. Die Ligation erfolgte entweder für 1-2 Std. bei RT oder über Nacht bei 4 °C.

4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe von DNA Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Da Nukleinsäuren negativ geladene Phosphatgruppen besitzen, bewegen sie sich in einem Agarosegel ihrer Größe entsprechend zur Anode, sobald ein elektrisches Feld von 160 V angelegt ist. Die Auftrennung erfolgt nach Sambrook (2001) in einem TBE- Puffersystem (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) mit 0,8- 4 % Agarosegelen. Die Gele wurden mit 0,1 µg/mL Ethidiumbromid versetzt, das sich an die DNA-Doppelhelix anlagert und im UV-Licht fluoresziert, so dass DNA Fragmente sichtbar gemacht werden können. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 6x Ladepuffer versetzt. Um die Größe der Fragmente zu bestimmen wurden je nach erwarteter Größe folgende Größenstandards verwendet: Gene Ruler 50 bp DNA Ladder und Gene Ruler 1 kb DNA Ladder. Sowohl die Größenstandards als auch der 6x Ladepuffer wurden von Thermo Scientific verwendet.

4.10 Extraktion aus Agarose-Gelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit der Firma Zymo Research nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.11 Sequenzierung

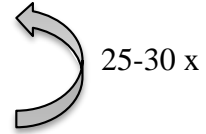
Die Sequenzierung wurde durch die Firma SeqLab durchgeführt und die Proben nach deren Vorgaben vorbereitet.

4.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde eine PCR durchgeführt und dabei die Phusion® High-Fidelity Polymerase der Firma New England Biolabs verwendet (Tabelle 15). Die Polymerase zeichnet sich durch hohe Geschwindigkeit und eine geringe Fehlerrate aus. Die dabei verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion hergestellt und auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt.

Tabelle 15| Phusion-PCR

PCR-Ansatz:	PCR-Programm:	
10 µL 5x Phusion HF oder GC Puffer	98 °C	30''
1 µL dNTPs (10 mM)	98 °C	5-10''
0,25 µL Vorwärts-Primer (100 µM)	T _m +3 °C	10-30''
0,25 µL Rückwärts-Primer (100 µM)	72 °C	15-30''/ kb
0,5 µL Phusion DNA-Polymerase (2 U/mL)	72 °C	5-10'
Template 50-250 ng DNA	4 °C	
auf 50 µL auffüllen mit H ₂ O _{bidest.}		

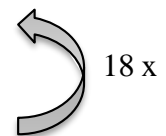


4.13 Pfu-Mutagenese

Die *Pfu*-Mutagenese wurde in dieser Arbeit verwendet, um in den Genen *prp4*, *res1* und *ppk8* Punktmutationen einzufügen. Dazu wurden die Gene in die Vektoren pGEX-6p-1 bzw. pUC19 kloniert und in der Mutagenese eingesetzt. Bei der dabei verwendeten Polymerase handelt es sich um die *PfuTurbo* DNA-Polymerase der Firma Agilent Technologies, die sich durch eine hohe Geschwindigkeit, sowie eine geringe Fehlerrate auszeichnet. Um die Mutagenese durchzuführen, wurde der folgende Ansatz verwendet (Tabelle 16):

Tabelle 16| Pfu-Mutagenese

Pfu-Mutagenese Ansatz:	Programm:	
5 µL 10x Pfu-Reaktionspuffer	95 °C	30''
4 µL dNTPs (10 mM)	95 °C	30''
1 µL Vorwärts-Primer (aus der 1:7 Verdünnung der 100 µM Stammlösung)	T _m -5 °C	1'
1 µL Rückwärts-Primer (aus der 1:7 Verdünnung der 100 µM Stammlösung)	68 °C	1'/ kb
1 µL PfuTurbo DNA-Polymerase (2,5 U/µL)	4 °C	
200 ng Plasmid-DNA		
auf 50 µL auffüllen mit H ₂ O _{bidest.}		



Nach Abschluss der Mutagenese Reaktion wurden die Proben auf Eis gestellt, 1 µL des Restriktionsenzym *DpnI* (10 U) hinzugegeben und 60 Min. bei 37 °C inkubiert. Dadurch dass

DpnI ausschließlich methylierte DNA schneidet, wurde der parentale DNA-Strang verdaut und so auf den neu synthetisierten Strang selektioniert. Anschließend wurden 10 µL des Ansatzes in kompetente *E. coli* Zellen (XL1Blue, Dh5α) transformiert. Die positiven Klone, die die gesetzten Mutationen enthalten, wurden nach Isolierung des Plasmids durch eine Restriktionsanalyse identifiziert.

4.14 *In vitro* Mutagenese nach Kunkel (1985)

Die gerichtete *in vitro* Mutagenese nach Kunkel (1985) wurde verwendet um Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in DNA einzufügen. Dazu wird ein Vektor benötigt, der sowohl als doppelsträngige, wie auch als einzelsträngige DNA isoliert werden kann.

Die zu mutierende DNA wurde in den M13mp18/19 Vektor kloniert und anschließend in den *E. coli* Stamm XL1Blue transformiert (4.2, S.90). Nach dem Hitzeschock allerdings, wurden die kompetenten Zellen zusammen mit 200 µL wachsenden XL1Blue Zellen in 5 mL auf 42 °C temperierten Soft-Top Agar gegeben, gut gemischt und auf M13 Agarplatten gegossen. Nachdem der Soft-Top Agar fest geworden ist, wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Phagen-Plaques aus dem Agar ausgestochen, erneut mit 200 µL wachsenden XL1Blue Zellen gemischt, nach 5-10 Min. Inkubation bei RT in 5 mL dYT Medium gegeben und 3-4 Std bei 37 °C auf dem Schüttler wachsen gelassen. Die doppelsträngige RF Form des M13 Phagen wird durch Zentrifugation für 1 Min. bei 13.000 UpM von den einzelsträngigen Phagenpartikeln abgetrennt. Diese befinden sich nun im Überstand und können zur Infektion von weiteren *E. coli* Zellen verwendet werden.

Um die Mutagenese durchführen zu können, wird Uracil-haltige Einzelstrang-DNA (ssUDNA) benötigt. Dazu wurden 200 µL einer wachsenden *E. coli* CJ236 Kultur im Verhältnis 5:1 mit Phagen infiziert, 5-10 Min. bei RT inkubiert, anschließend in 5 mL dYT Medium überführt und für 4-5 Std. bei 37 °C geschüttelt. Der Stamm CJ236 besitzt Mutationen in den Genen *dut* und *ung*, was dazu führt, dass es zu einem gehäuften Einbau von dUTP in die DNA kommt. Je 2 mL des Bakterien-Phagen-Gemischs werden in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und für 5 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. 1,4 mL des Überstands, der die einzelsträngigen Phagenpartikel enthält, wird in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µL PEG/NaCl (20 % (w/v) PEG 4000, 2,5 M NaCl) Lösung für 20 Min. bei RT gefällt. Nach 20 Min. Zentrifugation bei 13.000 UpM wird das Pellet in 200 µL H₂O_{bidest.} gelöst und eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Die ssUDNA wird über Nacht bei -20 °C durch Zugabe von 0,1 Vol. 3M NaAc und 2,5 Vol. 96 % EtOH gefällt. Nach 20 Min. Zentrifugation

bei 4 °C und 13.000 UpM wird die DNA mit 400 µL 70 % EtOH gewaschen, in der Speed Vac getrocknet und in 10 µL H₂O_{bidest.} gelöst.

Die *in vitro* Mutagenese Reaktion besteht aus zwei Schritten. Zunächst wurde ein 5'-phosphoryliertes Oligonukleotid, das die Mutation trägt, mit der ssUDNA hybridisiert. Dazu wurden 20-100 ng ssUDNA, 1,5 pmol Primer und 1 µL 10x Annealing-Puffer (200 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM MgCl₂, 500 mM NaCl) mit H₂O_{bidest.} auf 10 µL aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde von 80 °C auf 10 °C langsam abkühlt und auf Eis gestellt. Dieses hybridisierte Oligonukleotid dient nun als Primer für die DNA Synthese. Zur Annealing Reaktion wurden anschließend 1 µL 10x Synthese-Puffer (je 5 mM dATP, dCTP, dGTP dTTP, 10 mM ATP, 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT), 1 µL T4 DNA Ligase (1 U/µL) und 1 µL T7 DNA Polymerase (1 U/µL) gegeben. Der Ansatz wurde erst für 10 Min. auf Eis stehen gelassen, dann 10 Min. bei RT und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 70 µL Stopp-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) wurde die Reaktion beendet. 5 µL des Mutagenese Ansatzes wurden für die Transformation verwendet. Während der Reaktion verlängert die T7-DNA Polymerase das 3'-OH-Ende und synthetisiert den Minusstrang. Anschließend schließt die T4 DNA Ligase den Einzelstrangbruch, so dass ein doppelsträngiges DNA-Molekül entsteht. Dieses wird in einen *E. coli* Stamm, der *dut*⁺ und *ung*⁺ ist, transformiert. Dieser baut den Uracil-haltigen Strang ab, so dass ausschließlich der mutierte Strang übrig bleibt. Nachdem erneut die doppelsträngige DNA isoliert wurde, konnte durch einen Restriktionsverdau die positiven Klone identifiziert werden.

4.15 Yeast Recombinational Cloning (YRC)

Die in dieser Arbeit entstandenen Genkonstrukte wurden über das YRC hergestellt, das von Ma et al (1987) erfunden und über die letzten Jahre weiterentwickelt und verbessert wurde (Gibson, 2009; Oldenburg et al, 1997). Dabei werden ein linearisierter Vektor und DNA Fragmente, die 20-30 nt lange überlappende Sequenzen an ihren Enden besitzen *in vivo* in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* rekombiniert.

Zuerst wurden die DNA-Fragmente durch die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase der Firma New England Biolabs amplifiziert, wobei Primer benutzt wurden, die die Überhänge zum angrenzenden Fragment oder zum linearisierten Vektor pRS426 generieren. Nachdem die Fragmente amplifiziert wurden, wurden diese über eine Phenol/Chloroform-Fällung gereinigt und angereichert. Danach wurden alle Fragmente, sowie der mit *Bam*HI und *Hind*III geschnittene Vektor, in den *S. cerevisiae* Stamm FY834, der auxotroph für Uracil ist transformiert. Um die Transformation durchzuführen, wurde eine 50 mL Vorkultur des

S. cerevisiae Stamms FY834 in SD+Uracil Flüssigmedium angesetzt und über Nacht bei 30 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in 100 mL SD+Uracil-Medium so verdünnt, dass sie eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/mL hat. Nach 4-5 Stunden weiterem Schütteln bei 30 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation für 3 Min. bei 6000 UpM geerntet. Anschließend wurde das Pellet mit 25 mL H₂O_{bidest.} gewaschen und in 1 mL H₂O_{bidest.} resuspendiert. 100 µL der Zellsuspension wurden in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß gegeben, 1 Min, bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den Zellen wurden neben 0,7 µg Plasmid und 1-2 µg der PCR-Fragmente folgende Lösungen gegeben:

240 µL	PEG 3350, 50 %
36 µL	LiAc, 1M
50 µL	ssDNA, 2 mg/mL
34 µL	DNA + H ₂ O _{dd}

Die Zellen wurden in der Lösung durch Vortexen resuspendiert und für 40 Min. bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Um den Überstand zu entfernen, wurden die Zellen dann für 30 Sek. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µL H₂O_{bidest.} gelöst, in unterschiedlichen Konzentrationen auf SD–Uracil Platten ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.16 Plasmid-Präparation aus *S. cerevisiae*

Um nach dem YRC die Plasmid DNA, die das rekombinierte Konstrukt enthält, aus der Hefe zu isolieren, wurden die Platten mit 2 mal 5 mL H₂O_{bidest.} abgewaschen und durch Zentrifugation für 3 Min. bei 6000 UpM geerntet. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 1 mL H₂O_{bidest.} gelöst. Die Zellen wurden in ein 2 mL Schraubdeckelröhrchen überführt, 1 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Aufschluss wurden die Zellen in 300 µL Lösung I (50 mM Glukose, 25 mM Tris HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und mit 0,3 g Glasperlen versetzt. Im Beadbeater (Precellys24, Peqlab) wurden die Zellen bei 5700 UpM für 2 mal 30 Sekunden aufgeschlossen. Anschließend wurden 600 µL Lösung II (200 mM NaOH, 1 % SDS) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Danach wurden 450 µL Lösung III (60 mL 5M Kaliumacetat, 11,5 mL Eisessig, 28,5 mL H₂O_{bidest.}) hinzugefügt und erneut vorsichtig gemischt. Um die Zelltrümmer zu entfernen wurde für 15 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand in 2 neue 2 mL Eppendorfgefäße überführt. Danach wird die DNA mit Ethanol gefällt, gewaschen, getrocknet und in 30 µL H₂O_{bidest.} gelöst.

5 Methoden zur Untersuchung von *S. pombe*

5.1 Kreuzung von *S. pombe* Stämmen

Um zwei Stämme miteinander kreuzen zu können, müssen diese die unterschiedlichen Paarungstypen h^S und h^{+N} besitzen. Jeweils eine Impföse jedes Stamms wurde in 100 μ L 0,85 % NaCl gegeben und miteinander vermischt. Diese Zellsuspension wurde danach auf eine SPA Platte getropft und zwei Tage bei 25 °C inkubiert. Durch den Stickstoffmangel in der Platte verschmelzen die Zellen unterschiedlichen Paarungstyps miteinander zu einer Zygote. Daraufhin durchlaufen die Zellen die Meiose, wodurch ein Ascus entsteht, der vier haploide Sporen enthält (Gutz H et al, 1974). Diese sogenannten Tetraden können, nachdem sie dünn auf einer Vollmediumplatte ausgestrichen und für 2 Stunden bei 25 °C inkubiert wurden, mit dem Mikromanipulator (Singer Instruments) ausgelegt und nach mehreren Tagen Inkubation auf ihren Genotyp getestet werden.

5.2 Transformation in *S. pombe*

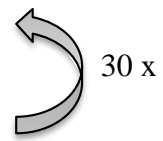
Um Gen-Konstrukte in das Genom der Hefe zu integrieren, wurde eine Transformation in *S. pombe* durchgeführt. Dazu wurde eine Vorkultur in EMM Medium angesetzt und über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Damit wurde am nächsten Tag eine Hauptkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,07-0,1 angesetzt und geerntet, nachdem sie eine OD₆₀₀ von 0,6-0,9 erreicht hatte. Die Zellen wurden 3 Min. bei 3000 UpM abzentrifugiert und zweimal mit 40 mL sterilem H₂O_{bidest.} gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 mL TE/LiAc (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gewaschen, erneut für 3 Min. bei 3000 UpM pelletiert und in 1 mL TE/LiAc aufgenommen. Nun wurden die Zellen für 15 Min. bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Für jeden Transformationsansatz wurden 100 μ L der Zellsuspension in ein 2 mL Eppendorfgefäß gegeben und 10 μ L frisch denaturiertes Lachs Sperma DNA (10 mg/mL), sowie die zu transformierende DNA hinzugefügt. Für die Transformation von zirkulären Plasmiden wurden 0,5-2 μ g eingesetzt. Bei der Integration in das *S. pombe* Genom wurden 10 μ g linearisiertes Plasmid oder PCR-Produkt verwendet. Der Ansatz wurde gemischt und für 30 Min. bei 30 °C inkubiert. Nun wurden 500 μ L TE/LiAc/PEG (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 40 % PEG 4000) dazu gegeben und für weitere 30 Min. bei 30 °C inkubiert. Der Hitzeschock wurde im Wasserbad für 20 Min. bei 42 °C durchgeführt. Die Zellen wurden danach für 5 Min. bei 6000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um das TE/LiAc/PEG möglichst vollständig zu entfernen, wurden die Zellen abschließend für 1 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 μ L sterilem H₂O_{bidest.} gelöst. Die Zellen wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und mehrere Tage bei 30 °C inkubiert.

5.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde verwendet, um nach der Transformation in die Hefe mögliche positive Klone zu identifizieren, ohne genomische DNA isolieren zu müssen. Dazu wurde ein Teil der Hefe-Kolonie in 30 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ resuspendiert und 10,2 μL direkt zum PCR-Ansatz dazugegeben. Verwendet wurde die Dream *Taq*-Polymerase der Firma Thermo Scientific. Nach Abschluss der PCR wurden 7 μL PCR-Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen.

Tabelle 17| Kolonie-PCR

PCR-Ansatz:	PCR-Programm:	
10,2 μL Hefesuspension	95 °C	5'
1,25 μL 10x Green-Puffer	95 °C	30''
0,3 μL dNTPs (10 mM)	$T_m - 5$ °C	30''
0,25 μL Vorwärts-Primer (100 μmol)	72 °C	1' / kb
0,25 μL Rückwärts-Primer (100 μmol)	72 °C	5'
0,25 μL Dream <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μL)	4 °C	



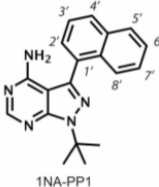
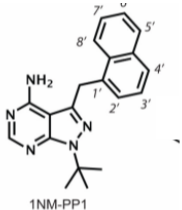
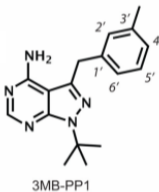
5.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pombe*

Um chromosomale DNA aus *S. pombe* zu isolieren wurden 4 mL YE- Medium mit Hefezellen angeimpft und über Nacht bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 1 Min. bei 13.000 UpM in einem 2 mL Schraubdeckelröhrchen geerntet und mit 2 mL sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Um die Zellen zu lysieren, wurden 400 μL Lysis Puffer (2 % Triton X-100 (v/v), 1 % SDS (w/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), 0,3 g Glasperlen (Durchmesser: 0,5 mm) und 400 μL PCIA hinzugegeben. Die Zellen wurden zweimal für 30 Sek. mit 5,7 m sek^{-1} im BeadBeater (Precellys24, Peqlab) aufgeschlossen. Im Anschluss wurde für 15 Min. mit 13.000 UpM zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurde 1 Vol. PCIA dazugegeben, gevortext und erneut 15 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß gegeben und mit 1 Vol. Chloroform vermischt. Nach starkem Vortexen wurde erneut zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Nun wurde die DNA durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol gefällt. Nach 20 Min. zentrifugieren bei 13.000 UpM wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wird erneut für 10 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert und das Pellet in der SpeedVac getrocknet. Die DNA wurde in 30 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst.

5.5 ATP-analoge Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren sind in Tabelle 18 dargestellt. Alle drei Inhibitoren wurden von der Firma Toronto Research Chemicals hergestellt. Die Inhibitoren wurden in DMSO zu einer Konzentration von 100 mM gelöst und anschließend bei -20 °C gelagert.

Tabelle 18| Inhibitoren

Strukturformel	Bezeichnung und CAS-Nummer	Chemischer Name
 1NA-PP1	1NA-PP1 221243-82-9	4-Amino-1-tert-butyl-3-(1'-naphthyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
 1NM-PP1	1NM-PP1 221244-14-0	4-Amino-1-tert-butyl-3-(1'-naphthylmethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
 3MB-PP1	3MB-PP1 956025-83-5	4-Amino-1-tert-butyl-3-(3-methylbenzyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine

5.6 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) von *S pombe* Kulturen wurde mit dem Gerät FACS-Calibur der Firma Becton-Dickinson durchgeführt. Die Zellzahl der Proben wurde zuerst auf $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ eingestellt, durch Zentrifugation bei 3000 UpM für 3 Min. geerntet und anschließend mit 2 mL eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen durch Zugabe von 300 μL eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ sowie 700 μL eiskaltem 96 % EtOH fixiert. Nun konnten die Zellen bei -80 °C eingefroren werden. Um die Zellen anfärben zu können, wurden die aufgetauten Zellen erst mit 1 mL 0,05 M Natriumcitrat (pH7-8) gewaschen und für 3 Min. bei 3000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 500 μL 0,05 M Natriumcitrat (pH7-8, 1 mg/mL RNase A) gelöst und in ein lichtundurchlässiges Eppendorfgefäß überführt. Zum Abbau der RNA durch die RNase A wurden die Zellen für 3 Std. bei 37 °C inkubiert. Nach dem Verdau wurden die gelösten Zellen mit 450 μL 0,05 M

Natriumcitrat und 50 μL 0,05 M Natriumcitrat mit 200 $\mu\text{g/mL}$ Propidiumiodid gemischt und über Nacht bei 4 °C gefärbt. Am nächsten Tag wurde die FACS-Analyse durchgeführt.

5.7 Fluoreszenzmikroskopie

Um in *S. pombe* die Zellkerne und Septen fluoreszenzmikroskopisch betrachten zu können, wurden diese durch Fluoreszenzfarbstoffe angefärbt. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) bindet hauptsächlich an doppelsträngige DNA und bei Anregung mit ultraviolettem Licht zeigen sich die Zellkerne blau angefärbt. Calcofluor white ist ein nicht-spezifisches Fluorochrom und bindet an Cellulose und Chitin, was in Zellmembranen und Septen zu finden ist. Die Septen der Hefe enthalte mehr Chitin, was dazu führt, dass dort mehr Calcofluor white gebunden wird und damit eine stärkere Fluoreszenz auftritt, als an den Zellmembranen. Um die Zellen mit DAPI und Calcofluor white anfärben zu können, wurden 300 μL einer *S. pombe* Hauptkultur entnommen, einmal mit 1x PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na_2HPO_4) gewaschen und in 100 μL 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurden 5-8 μL der Zellsuspension auf einen Objektträger getropft und bei 60 °C eingetrocknet. Nun wurde sowohl 1 μL DAPI (10 $\mu\text{g/mL}$ in PBS), als auch 1 μL Calcofluor white (1 mg/mL in PBS) aufgetropft und nach 2-3 Min. mit dem Mikroskop untersucht. Dazu wurde das Mikroskop Axiophot 2 der Firma Zeiss verwendet, welches ein Objektiv mit 100-facher Vergrößerung besitzt. Für die Aufnahmen wurde eine PCO Pixelfly Kamera verwendet, die durch eine Software bedient wurde, welche von der AG Schnabel (TU Braunschweig) entwickelt worden ist.

5.8 RNA-Isolierung aus *S. pombe* nach Nischt et al (1986)

Die Isolierung der Gesamt-RNA von *S. pombe* wurde nach dem Protokoll von Nischt et al (1986) durchgeführt. Dazu wurden 20-50 mL einer wachsenden *S. pombe* Kultur durch 3 Min. Zentrifugation bei 3000 UpM geerntet, mit 20 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen und das Pellet bei -80 °C eingefroren. Um die RNA zu isolieren, wurden zu dem aufgetauten Pellet 0,3 g Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) und 400 μL LETS-Puffer mit 1 % LiDS (100 mM LiCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM EDTA, Lithiumsalz in 1 % LiDS) gegeben. Die Zellen wurden zweimal für 30 Sek. mit 5,7 m sek^{-1} im BeadBeater (Precellys24, Peqlab) aufgeschlossen. Anschließend wurden 400 μL LETS-Puffer (0,2 % LiDS) hinzugefügt und gevortext. Nun wurden 800 μL PCIA dazu gegeben, gevortext und 10 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und erneut mit 800 μL PCIA extrahiert. Die wässrige Phase wurde wieder in ein neues Eppendorfgefäß überführt und um Phenolreste zu entfernen, mit 800 μL Chloroform extrahiert. Um die RNA

zu fällen wurde die wässrige Phase in ein Corex-Röhrchen gegeben und mit 40 µL 5 M LiCl sowie 5 mL 96 % EtOH versetzt. Nun folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 20 Min. bei 13.000 UpM 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 2,5 mL 70 % EtOH gewaschen und in der Speed-Vac getrocknet. Die RNA wurde in 200 µL DEPC-Wasser gelöst und bei -80 °C eingefroren.

5.9 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um die Spleißeffizienz ausgewählter Gene untersuchen zu können, wurde eine Reverse Transkriptase PCR in einem Ein-Schritt System durchgeführt. Dazu wurde, wie unter Absatz 5.8 beschrieben, die gesamte RNA mit Hilfe einer Phenol/Chloroform-Extraktion aus den Hefezellen isoliert.

5.9.1 DNaseI-Verdau

Zunächst wurde ein Verdau mit DNaseI durchgeführt werden, um Reste genomischer DNA zu entfernen. Dazu wurden 5 µg RNA in einem 25 µL Ansatz mit RNase-freier DNaseI (RQ1 Promega) für 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Stopp-Puffers und 10 minütigem Erhitzen auf 80 °C gestoppt und die RNA direkt in der RT-PCR verwendet.

5.9.2 RT-PCR Bedingungen und Oligos

Zur Durchführung der RT-PCR wurde die *Tth*-Polymerase der Firma Roboklon verwendet. Die aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* stammende hitzestabile *Tth*-Polymerase besitzt in Anwesenheit einer hohen Konzentration an Mangan-Ionen Reverse Transkriptase Aktivität, wobei zeitgleich die Aktivität der DNA-Polymerase gehemmt wird. Außerdem kann der RT Schritt mit diesem Enzym bei 70 °C durchgeführt werden, was hilft Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion hergestellt und sind neben der jeweils eingesetzten RNA-Menge, der verwendeten Schmelztemperatur, sowie der Anzahl der Zyklen in Tabelle 20 angegeben. Die RT-PCR besteht aus zwei Schritten, die zwar in einem PCR-Gefäß aber in unterschiedlichen Puffersystemen stattfinden. Im ersten Schritt findet die Reverse-Transkription statt, die dazu führt, dass cDNA entsteht. Nachdem die cDNA-Synthese abgeschlossen ist, wird ein zweiter Mix dazugegeben, in dem die PCR stattfindet, die zu einer Amplifikation der einzelnen DNA-Fragmente führt.

Tabelle 19| RT-PCR Protokoll


PCR-Ansatz:		PCR-Programm:	
Mix 1:		Tm	3'
0,2-0,6 µg RNA		70 °C	25'
0,5 µL 10x RT-Puffer		STOP → Zugabe Mix2	
0,5 µL dNTPs (10 mM)			
0,5 µL Rückwärts-Primer (10 mM)			
0,2 µL MnCl ₂ (50 mM)			
0,25 µL <i>Tth</i> -Polymerase (5 U/µL)			
mit H ₂ O _{bidest.} auf 5 µL auffüllen			
Mix 2:		94 °C	30''
0,3 µL EGTA		Tm-5 °C	30''
2 µL 10x Puffer Pol A		72 °C	2'/kb
1,6 µL dNTPs		4°C	
2,5 µL Vorwärts-Primer (10mM)		 28-45x	
2 µL Rückwärts-Primer (10 mM)			
0,8 µL MgCl ₂ (50 mM)			
10,8 µL H ₂ O _{bidest.}			

Tabelle 20| RT-PCR Oligos und Bedingungen

Oligo	Sequenz 5'-3'	RNA (µg)	Tm (°C)	Zyklen
ade2_E1_F	ATATATGGATCCGCGAGAACTGGTGTAATGTTTCC	0,2	53	28
ade2_E2_R	ATCCTTTGCGATAATGTTGATGTCT			
ade2_E2_F	TATATAGTCGACCGAGCACAGACATCAACATTATCG	0,2	51,5	28
ade2_E3_R	AATTCAGCCCAATGATACAAGTGAT			
cdc2_E1_F	TACCGCTAGGTTGCTTCTTTT	0,6	58,5	45
cdc2_E3_R	GCCCCAGTTTCTGAAATTGCG			
cdc2_E3_F	CTTGCGAGGTCATTTGGTGT	0,6	54,5	45
cdc2_E5_R	TGGGCAGGGTCATAACAAG			

Fortsetzung auf nächster Seite

Oligo	Sequenz 5'-3'	RNA (µg)	Tm (°C)	Zyklen
fta4_E1_F	CTATGCGCCCTCCAAAGGATTG	0,2	55,1	28
fta4_E2_R	GCCATGGATGGGGAAGTG			
mrp17_E1_F	CTAGGCCAGCTGCAAATG	0,2	55,5	28
mrp17_E2_R	CTGTGGGGTTACTGTAAAAGG			
mrp17_E2_F	GGTGTGGTCGTTGATGTTG	0,2	54,3	28
mrp17_E3_R	GATAATTGGACAGCTCTGCG			
ppk8_Mut_F	CGGAAGAGAACTCTAATAATTTATTTTGCAA	0,6	60	45
ppk8_WT_F	CGGAAGAGAACTCTAATAATTTATTTTGCAC			
ppk8_E2_R	CGCTCTCTTCACTCTCAATGG			
pyp3_E1_F	GAAAGCGCTGGCTAGAAACC	0,2	55,8	28
pyp3_E2_R	GATGGCGTTCCTCAATTTGG			
rbp5_E1_F	ATATATGAATTCTTGGAAGACAGCTCATCAATTAGTC	0,2	51	28
rbp5_E2_R	TATATAGAGCTCGAATTGATCCAACGTCAAATCTAAT			
rbp5_E2_F	ATATATGGATCCTGAATTAGATTTGACGTTGGATCAA	0,2	52	28
rbp5_E3_R	ATATATGAGCTCTAGATTGTGCCTTTATTTGAATCAT			
res1_E1_F	TTCGCTCAAAAGGGACTTCATG	0,6	55	45
res1_E2_R	AAGGCCGGGAAAATGACTTTTTT			
res1_Mut_F	GAAAAAATTCAGGTGGTTGTGGAAGC	0,6	55	45
res1_WT_F	GGGACTTCATGAAAAAATTCAGGTGG			
res2_E1_F	TTGGTGCGCATGAAAAAGTACA	0,6	56,6	45
res2_E2_R	CGGCCACGTACAGAAGGCT			
tbp1_E1_F	AATTAAGGATCCGGATGCAGAAGTTTCAAAAAATGAA GGTG	0,2	53	28
tbp1_E2_R	TTACGTGAGCTCAGCGCAATAGTTTGTGAGATCAAGAC G			
tbp1_E2_F	ATATATGGATCCTGTCGTCTTGATCTCAAACCTATTG CG	0,2	53	28
tbp1_E3_R	TATATAGAGCTCTTGCCACCCAAAACAACCATTTTAC C			

Fortsetzung auf nächster Seite

Oligo	Sequenz 5'-3'	RNA (µg)	T _m (°C)	Zyklen
tbp1_E3_F	ATATTAGGATCCCATTGTAGGAAGTTGCGATGTTAAA TTTCCA	0,2	53	28
tbp1_E4_R	ATATATGAGCTCCTTTTCGCACCAGTTAAAACAATTTT ACCA			
ura4_M1_F	CTTGGGCTCATATCACAAATTGCC	0,2	54	28
ura4_M1_R	CAGCCCGTCTCCTTTAACATCC			

5.10 RNA-Sequenzierung von Prp4_{as2}

Um zu untersuchen, welche Auswirkung die Inhibition der Prp4_{as2} Kinase auf die Spleißeffizienz aller *S. pombe* Introns hat, wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Die RNA-Sequenzierung wurde von Angel Guerra-Moreno und José Ayté (Oxidative Stress und Cell Cycle Research Group, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain) vorgenommen. Die bioinformatische Auswertung erfolgte durch Luca Cozzuto (Bioinformatics Core, Centre de Regulació Genòmica (CRG), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain). Für jedes Intron wurde, ohne Inhibition der Kinase, sowie 30 und 60 Min. nach Zugabe von 10 µM 1NM-PP1, die Anzahl der ungespleißten und gespleißten Transkripte bestimmt und der Logarithmus zur Basis 2 für das Verhältnis der beiden Werte berechnet. Der dabei errechnete Wert wird als Relative Splicing Efficiency Index (RSEI) bezeichnet. Handelt es sich bei dem RSEI um einen positiven Wert, liegt mehr mRNA als prä-mRNA vor. Liegt ein negativer Wert vor, wurden mehr ungespleißte als gespleißte Transkripte bei der Sequenzierung gefunden.

V Referenzen

Adachi H, Yu YT (2014) Insight into the mechanisms and functions of spliceosomal snRNA pseudouridylation. *World journal of biological chemistry* **5**: 398-408

Aebi M, Hornig H, Padgett RA, Reiser J, Weissmann C (1986) Sequence requirements for splicing of higher eukaryotic nuclear pre-mRNA. *Cell* **47**: 555-565

Alahari SK, Schmidt H, Käufer NF (1993) The fission yeast *prp4+* gene involved in pre-mRNA splicing codes for a predicted serine/threonine kinase and is essential for growth. *Nucleic acids research* **21**: 4079-4083

Aligianni S, Lackner DH, Klier S, Rustici G, Wilhelm BT, Marguerat S, Codlin S, Brazma A, de Bruin RA, Bähler J (2009) The fission yeast homeodomain protein Yox1p binds to MBF and confines MBF-dependent cell-cycle transcription to G1-S via negative feedback. *PLoS genetics* **5**: e1000626

Anthony KC, Pomeranz Krummel DA. (2013) Spliceosome. In ed. John Wiley and Sons (ed.), *eLS* Ltd.

Aranda S, Laguna A, de la Luna S (2011) DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**: 449-462

Aravind L, Watanabe H, Lipman DJ, Koonin EV (2000) Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11319-11324

Arnez JG, Steitz TA (1994) Crystal structure of unmodified tRNA(Gln) complexed with glutamyl-tRNA synthetase and ATP suggests a possible role for pseudo-uridines in stabilization of RNA structure. *Biochemistry* **33**: 7560-7567

Ayté J, Leis JF, Herrera A, Tang E, Yang H, DeCaprio JA (1995) The *Schizosaccharomyces pombe* MBF complex requires heterodimerization for entry into S phase. *Molecular and cellular biology* **15**: 2589-2599

Basi G, Schmid E, Maundrell K (1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* *nmt1* promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**: 131-136

Bennett EM, Lever AM, Allen JF (2004) Human immunodeficiency virus type 2 Gag interacts specifically with PRP4, a serine-threonine kinase, and inhibits phosphorylation of splicing factor SF2. *Journal of virology* **78**: 11303-11312

Berget SM, Moore C, Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 3171-3175

Berglund JA, Abovich N, Rosbash M (1998) A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes & development* **12**: 858-867

Berglund JA, Chua K, Abovich N, Reed R, Rosbash M (1997) The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* **89**: 781-787

Bishop AC, Ubersax JA, Petsch DT, Matheos DP, Gray NS, Blethrow J, Shimizu E, Tsien JZ, Schultz PG, Rose MD, Wood JL, Morgan DO, Shokat KM (2000) A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**: 395-401

Bitton DA, Atkinson SR, Rallis C, Smith GC, Ellis DA, Chen YY, Malecki M, Codlin S, Lemay JF, Cotobal C, Bachand F, Marguerat S, Mata J, Bähler J (2015) Widespread exon skipping triggers degradation by nuclear RNA surveillance in fission yeast. *Genome research* **25**: 884-896

Bon E, Casaregola S, Blandin G, Llorente B, Neuvéglise C, Munsterkötter M, Guldener U, Mewes HW, Van Helden J, Dujon B, Gaillardin C (2003) Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic acids research* **31**: 1121-1135

Bottner CA, Schmidt H, Vogel S, Michele M, Käufer NF (2005) Multiple genetic and biochemical interactions of Brr2, Prp8, Prp31, Prp1 and Prp4 kinase suggest a function in the control of the activation of spliceosomes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current genetics* **48**: 151-161

Brody E, Abelson J (1985) The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* **228**: 963-967

Burge CB, Tuschl T, Sharp PA (1999) Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes. In *The RNA World Second Edition*, Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF (eds), pp pp. 525-560. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York

Busch A, Hertel KJ (2012) Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **3**: 1-12

Carlile TM, Rojas-Duran MF, Zinshteyn B, Shin H, Bartoli KM, Gilbert WV (2014) Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature* **515**: 143-146

Carnahan RH, Feoktistova A, Ren L, Niessen S, Yates JR, 3rd, Gould KL (2005) Dim1p is required for efficient splicing and export of mRNA encoding lid1p, a component of the fission yeast anaphase-promoting complex. *Eukaryotic cell* **4**: 577-587

Carpy A, Krug K, Graf S, Koch A, Popic S, Hauf S, Macek B (2014) Absolute proteome and phosphoproteome dynamics during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe* (Fission Yeast). *Molecular & cellular proteomics : MCP* **13**: 1925-1936

Cavalier-Smith T (1985) Selfish DNA and the origin of introns. *Nature* **315**: 283-284

Cavalier-Smith T (1987) The origin of eukaryotic and archaeobacterial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **503**: 17-54

Cavalier-Smith T (1991) Intron phylogeny: a new hypothesis. *Trends in genetics : TIG* **7**: 145-148

Cech TR (1986) The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell* **44**: 207-210

Charette M, Gray MW (2000) Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why. *IUBMB life* **49**: 341-351

Chen YI, Moore RE, Ge HY, Young MK, Lee TD, Stevens SW (2007) Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic acids research* **35**: 3928-3944

Cho S, Hoang A, Sinha R, Zhong XY, Fu XD, Krainer AR, Ghosh G (2011) Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 8233-8238

Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**: 1-8

Cipak L, Zhang C, Kovacicova I, Rumpf C, Miadokova E, Shokat KM, Gregan J (2011) Generation of a set of conditional analog-sensitive alleles of essential protein kinases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle* **10**: 3527-3532

Cohn WE (1959) 5-Ribosyl uracil, a carbon-carbon ribofuranosyl nucleoside in ribonucleic acids. *Biochimica et biophysica acta* **32**: 569-571

Cordin O, Beggs JD (2013) RNA helicases in splicing. *RNA biology* **10**: 83-95

Coudreuse D, Nurse P (2010) Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* **468**: 1074-1079

Crispino JD, Blencowe BJ, Sharp PA (1994) Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP. *Science* **265**: 1866-1869

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research* **14**: 1188-1190

Davis DR (1995) Stabilization of RNA stacking by pseudouridine. *Nucleic acids research* **23**: 5020-5026

Deckert J, Hartmuth K, Boehringer D, Behzadnia N, Will CL, Kastner B, Stark H, Urlaub H, Lührmann R (2006) Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Molecular and cellular biology* **26**: 5528-5543

Dellaire G, Makarov EM, Cowger JJ, Longman D, Sutherland HG, Lührmann R, Torchia J, Bickmore WA (2002) Mammalian PRP4 kinase copurifies and interacts with components of both the U5 snRNP and the N-CoR deacetylase complexes. *Molecular and cellular biology* **22**: 5141-5156

Egel R (1971) Physiological aspects of conjugation in fission yeast. *Planta* **98**: 89-96

Erkelenz S, Mueller WF, Evans MS, Busch A, Schöneweis K, Hertel KJ, Schaal H (2013) Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *RNA* **19**: 96-102

Fabrizio P, Dannenberg J, Dube P, Kastner B, Stark H, Urlaub H, Lührmann R (2009) The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Molecular cell* **36**: 593-608

Fantes PA (1977) Control of cell size and cycle time in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science* **24**: 51-67

Forsburg SL (2005) The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravitational and space biology bulletin : publication of the American Society for Gravitational and Space Biology* **18**: 3-9

Galisson F, Legrain P (1993) The biochemical defects of prp4-1 and prp6-1 yeast splicing mutants reveal that the PRP6 protein is required for the accumulation of the [U4/U6.U5] tri-snRNP. *Nucleic acids research* **21**: 1555-1562

Ganot P, Bortolin ML, Kiss T (1997) Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**: 799-809

Gao K, Masuda A, Matsuura T, Ohno K (2008) Human branch point consensus sequence is yUnAy. *Nucleic acids research* **36**: 2257-2267

Gao Q, Mechin I, Kothari N, Guo Z, Deng G, Haas K, McManus J, Hoffmann D, Wang A, Wiederschain D, Rocnik J, Czechtizky W, Chen X, McLean L, Arlt H, Harper D, Liu F, Majid T, Patel V, Lengauer C, Garcia-Echeverria C, Zhang B, Cheng H, Dorsch M, Huang SM (2013) Evaluation of cancer dependence and druggability of PRP4 kinase using cellular, biochemical, and structural approaches. *The Journal of biological chemistry* **288**: 30125-30138

Gateman KB, Rosenberg GH, Käufer NF (1988) Double-stranded sequencing, using mini-prep plasmids, in eleven hours. *BioTechniques* **6**: 951-952

Gibson DG (2009) Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic acids research* **37**: 6984-6990

Gilbert W (1987) The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **52**: 901-905

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-547

Görnemann J, Kotovic KM, Hujer K, Neugebauer KM (2005) Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Molecular cell* **19**: 53-63

Gottschalk A, Neubauer G, Banroques J, Mann M, Lührmann R, Fabrizio P (1999) Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP. *The EMBO journal* **18**: 4535-4548

Graveley BR (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* **6**: 1197-1211

Gregan J, Zhang C, Rumpf C, Cipak L, Li Z, Uluocak P, Nasmyth K, Shokat KM (2007) Construction of conditional analog-sensitive kinase alleles in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature protocols* **2**: 2996-3000

Groß T, Lützelberger M, Wiegmann H, Klingenhoff A, Shenoy S, Käufer NF (1997) Functional analysis of the fission yeast Prp4 protein kinase involved in pre-mRNA splicing and isolation of a putative mammalian homologue. *Nucleic acids research* **25**: 1028-1035

Groß T, Richert K, Mierke C, Lützelberger M, Käufer NF (1998) Identification and characterization of *srp1*, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and a RS domain typical of SR splicing factors. *Nucleic acids research* **26**: 505-511

Grützmann K, Szafranski K, Pohl M, Voigt K, Petzold A, Schuster S (2014) Fungal alternative splicing is associated with multicellular complexity and virulence: a genome-wide multi-species study. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **21**: 27-39

Gu J, Patton JR, Shimba S, Reddy R (1996) Localization of modified nucleotides in *Schizosaccharomyces pombe* spliceosomal small nuclear RNAs: modified nucleotides are clustered in functionally important regions. *RNA* **2**: 909-918

Gu X, Liu Y, Santi DV (1999) The mechanism of pseudouridine synthase I as deduced from its interaction with 5-fluorouracil-tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14270-14275

Gutz H, Heslot H, Leupold U, N L (1974) *Schizosaccharomyces pombe* In: King RC (ed) *Handbook of Genetics, vol 1, Plenum Press, New York*: pp 395-446

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580

Hanks SK, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**: 576-596

Harigaya Y, Yamamoto M (2007) Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **15**: 523-537

Hayles J, Nurse P (2001) A journey into space. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 647-656

Hedges SB (2002) The origin and evolution of model organisms. *Nature reviews Genetics* **3**: 838-849

Hoffmann A, Horikoshi M, Wang CK, Schroeder S, Weil PA, Roeder RG (1990) Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* TFIID gene reveals a strong conservation of functional domains present in *Saccharomyces cerevisiae* TFIID. *Genes & development* **4**: 1141-1148

Hudson GA, Bloomingdale RJ, Znosko BM (2013) Thermodynamic contribution and nearest-neighbor parameters of pseudouridine-adenosine base pairs in oligoribonucleotides. *RNA* **19**: 1474-1482

Irimia M, Penny D, Roy SW (2007) Coevolution of genomic intron number and splice sites. *Trends in genetics : TIG* **23**: 321-325

Irimia M, Roy SW (2008) Evolutionary convergence on highly-conserved 3' intron structures in intron-poor eukaryotes and insights into the ancestral eukaryotic genome. *PLoS genetics* **4**: e1000148

Irimia M, Roy SW, Neafsey DE, Abril JF, Garcia-Fernandez J, Koonin EV (2009) Complex selection on 5' splice sites in intron-rich organisms. *Genome research* **19**: 2021-2027

Jamison SF, Pasman Z, Wang J, Will C, Lührmann R, Manley JL, Garcia-Blanco MA (1995) U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements. *Nucleic acids research* **23**: 3260-3267

Jurica MS, Moore MJ (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular cell* **12**: 5-14

Kanopka A, Mühlemann O, Akusjärvi G (1996) Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* **381**: 535-538

Karijolich J, Yu YT (2010) Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA biology* **7**: 192-204

Käufer NF, Potashkin J (2000) Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic acids research* **28**: 3003-3010

Kierzek E, Malgowska M, Lisowiec J, Turner DH, Gdaniec Z, Kierzek R (2014) The contribution of pseudouridine to stabilities and structure of RNAs. *Nucleic acids research* **42**: 3492-3501

Kohtz JD, Jamison SF, Will CL, Zuo P, Lührmann R, Garcia-Blanco MA, Manley JL (1994) Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**: 119-124

Konarska MM, Sharp PA (1988) Association of U2, U4, U5, and U6 small nuclear ribonucleoproteins in a spliceosome-type complex in absence of precursor RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 5459-5462

Kondo Y, Oubridge C, van Roon AM, Nagai K (2015) Crystal structure of human U1 snRNP, a small nuclear ribonucleoprotein particle, reveals the mechanism of 5' splice site recognition. *eLife* **4**

Koonin EV (2009) Intron-dominated genomes of early ancestors of eukaryotes. *The Journal of heredity* **100**: 618-623

Kotzer-Nevo H, de Lima Alves F, Rappsilber J, Sperling J, Sperling R (2014) Supraspliceosomes at defined functional states portray the pre-assembled nature of the pre-mRNA processing machine in the cell nucleus. *International journal of molecular sciences* **15**: 11637-11664

Ku C, Nelson-Sathi S, Roettger M, Sousa FL, Lockhart PJ, Bryant D, Hazkani-Covo E, McInerney JO, Landan G, Martin WF (2015) Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. *Nature* **524**: 427-432

Kuhn AN, Käufer NF (2003) Pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe*: regulatory role of a kinase conserved from fission yeast to mammals. *Current genetics* **42**: 241-251

Kunkel TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 488-492

Lambowitz AM, Zimmerly S (2011) Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**: a003616

Lane BG (1998) Historical perspectives on RNA nucleoside modifications. In: Grosjean, H, and Benne, R editors *Modification and Editing of RNA* ASM Press, Washington, DC 1-20

Leupold U (1950) Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C R Trav Lab Carlsberg, Ser Physiol* **24**: 381-480

Lewin B (1980) Alternatives for splicing: recognizing the ends of introns. *Cell* **22**: 324-326

Lindner P (1893) Schizosaccharomyces pombe n. sp. neuer Gärungserreger. *Wochenschr f Brauerei* **10**: 1298-1300

Lipp JJ, Marvin MC, Shokat KM, Guthrie C (2015) SR protein kinases promote splicing of nonconsensus introns. *Nature structural & molecular biology*

Liu S, Rauhut R, Vornlocher HP, Lührmann R (2006) The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA* **12**: 1418-1430

Liu X, McLeod I, Anderson S, Yates JR, 3rd, He X (2005) Molecular analysis of kinetochore architecture in fission yeast. *The EMBO journal* **24**: 2919-2930

Liu Y, Bishop A, Witucki L, Kraybill B, Shimizu E, Tsien J, Ubersax J, Blethrow J, Morgan DO, Shokat KM (1999) Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chemistry & biology* **6**: 671-678

Liu Z, Luyten I, Bottomley MJ, Messias AC, Houngninou-Molango S, Sprangers R, Zanier K, Krämer A, Sattler M (2001) Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. *Science* **294**: 1098-1102

Lochhead PA, Sibbet G, Morrice N, Cleghon V (2005) Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* **121**: 925-936

Logsdon JM, Jr., Tyshenko MG, Dixon C, J DJ, Walker VK, Palmer JD (1995) Seven newly discovered intron positions in the triose-phosphate isomerase gene: evidence for the introns-late theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 8507-8511

Lund M, Kjems J (2002) Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end. *RNA* **8**: 166-179

Lützelberger M, Bottner CA, Schwelnus W, Zock-Emmenthal S, Razanau A, Käufer NF (2010) The N-terminus of Prp1 (Prp6/U5-102 K) is essential for spliceosome activation in vivo. *Nucleic acids research* **38**: 1610-1622

Lützelberger M, Groß T, Käufer NF (1999) Srp2, an SR protein family member of fission yeast: in vivo characterization of its modular domains. *Nucleic acids research* **27**: 2618-2626

Lützelberger M, Käufer NF. (2012) The Prp4 Kinase: Its Substrates, Function and Regulation in Pre-mRNA Splicing. In Dr. Cai Huang (Ed.) (ed.), *Protein Phosphorylation in Human Health*. InTech.

Ma H, Kunes S, Schatz PJ, Botstein D (1987) Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**: 201-216

Ma X, Yang C, Alexandrov A, Grayhack EJ, Behm-Ansmant I, Yu YT (2005) Pseudouridylation of yeast U2 snRNA is catalyzed by either an RNA-guided or RNA-independent mechanism. *The EMBO journal* **24**: 2403-2413

Ma X, Zhao X, Yu YT (2003) Pseudouridylation (Psi) of U2 snRNA in *S. cerevisiae* is catalyzed by an RNA-independent mechanism. *The EMBO journal* **22**: 1889-1897

Massenet S, Motorin Y, Lafontaine DL, Hurt EC, Grosjean H, Branlant C (1999) Pseudouridine mapping in the *Saccharomyces cerevisiae* spliceosomal U small nuclear RNAs (snRNAs) reveals that pseudouridine synthase *pus1p* exhibits a dual substrate specificity for U2 snRNA and tRNA. *Molecular and cellular biology* **19**: 2142-2154

Millar JB, Lenaers G, Russell P (1992) Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *The EMBO journal* **11**: 4933-4941

Mitchison JM (1971) *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge: Cambridge University Press

Mitchison JM, Nurse P (1985) Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science* **75**: 357-376

Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in enzymology* **194**: 795-823

Neuvéglise C, Marck C, Gaillardin C (2011) The intronome of budding yeasts. *Comptes rendus biologies* **334**: 662-670

Newby MI, Greenbaum NL (2002) Sculpting of the spliceosomal branch site recognition motif by a conserved pseudouridine. *Nature structural biology* **9**: 958-965

Ni J, Tien AL, Fournier MJ (1997) Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* **89**: 565-573

Nischt R, Thuroff E, Käufer NF (1986) Molecular cloning of a ribosomal protein gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Current genetics* **10**: 365-370

Oldenburg KR, Vo KT, Michaelis S, Paddon C (1997) Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic acids research* **25**: 451-452

- Parker R, Siliciano PG, Guthrie C (1987) Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA. *Cell* **49**: 229-239
- Penny D, Hoepfner MP, Poole AM, Jeffares DC (2009) An overview of the introns-first theory. *Journal of molecular evolution* **69**: 527-540
- Perriman R, Ares M, Jr. (2010) Invariant U2 snRNA nucleotides form a stem loop to recognize the intron early in splicing. *Molecular cell* **38**: 416-427
- Pickrell JK, Pai AA, Gilad Y, Pritchard JK (2010) Noisy splicing drives mRNA isoform diversity in human cells. *PLoS genetics* **6**: e1001236
- Plass M, Agirre E, Reyes D, Camara F, Eyraas E (2008) Co-evolution of the branch site and SR proteins in eukaryotes. *Trends in genetics : TIG* **24**: 590-594
- Plath S (2015) Mutationen in der 5' Spleißstelle beeinflussen die Prp4 - Kinase Abhängigkeit beim Spleißen *Masterarbeit, Institut für Genetik, TU Braunschweig*
- Pomeranz Krummel DA, Oubridge C, Leung AK, Li J, Nagai K (2009) Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* **458**: 475-480
- Porter G, Brennwald P, Wise JA (1990) U1 small nuclear RNA from *Schizosaccharomyces pombe* has unique and conserved features and is encoded by an essential single-copy gene. *Molecular and cellular biology* **10**: 2874-2881
- Pötter S (2014) Analysis of the influence of splice site sequences on Prp4 kinase dependent splicing of a reporter gene in *S. pombe*. *Masterarbeit, Institut für Genetik, TU Braunschweig*
- Query CC, Moore MJ, Sharp PA (1994) Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: evidence for the bulged duplex model. *Genes & development* **8**: 587-597
- Raghuathan PL, Guthrie C (1998) RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Current biology : CB* **8**: 847-855
- Reddy R, Busch H (1988) Small nuclear RNAs: RNA sequences, structure, and modifications. In *Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles.*, Birnstiel MLe (ed), pp 1-37. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Richert K (2002) Untersuchungen zur Aufklärung des Prä-mRNA Spleißvorgangs in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*: Genetische und biochemische Charakterisierung der Interaktionen des *prp4* Gens. *PhD Thesis, Technische Universität Braunschweig*

Rino J, Carmo-Fonseca M (2009) The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus? *Trends in cell biology* **19**: 375-384

Roca X, Akerman M, Gaus H, Berdeja A, Bennett CF, Krainer AR (2012) Widespread recognition of 5' splice sites by noncanonical base-pairing to U1 snRNA involving bulged nucleotides. *Genes & development* **26**: 1098-1109

Roca X, Krainer AR, Eperon IC (2013) Pick one, but be quick: 5' splice sites and the problems of too many choices. *Genes & development* **27**: 129-144

Roca X, Sachidanandam R, Krainer AR (2005) Determinants of the inherent strength of human 5' splice sites. *RNA* **11**: 683-698

Rogozin IB, Carmel L, Csuros M, Koonin EV (2012) Origin and evolution of spliceosomal introns. *Biology direct* **7**: 11

Rogozin IB, Wolf YI, Sorokin AV, Mirkin BG, Koonin EV (2003) Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Current biology : CB* **13**: 1512-1517

Rosenberg GH, Alahari SK, Käufer NF (1991) prp4 from *Schizosaccharomyces pombe*, a mutant deficient in pre-mRNA splicing isolated using genes containing artificial introns. *Molecular & general genetics : MGG* **226**: 305-309

Roy SW, Irimia M (2009) Splicing in the eukaryotic ancestor: form, function and dysfunction. *Trends in ecology & evolution* **24**: 447-455

Roy SW, Irimia M (2014) Diversity and evolution of spliceosomal systems. *Methods Mol Biol* **1126**: 13-33

Sambrook J, Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning - A Laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

Schindler T, Sicheri F, Pico A, Gazit A, Levitzki A, Kuriyan J (1999) Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Molecular cell* **3**: 639-648

Schneider M, Hsiao HH, Will CL, Giet R, Urlaub H, Lührmann R (2010) Human PRP4 kinase is required for stable tri-snRNP association during spliceosomal B complex formation. *Nature structural & molecular biology* **17**: 216-221

Schwartz SH, Silva J, Burstein D, Pupko T, Eyraas E, Ast G (2008) Large-scale comparative analysis of splicing signals and their corresponding splicing factors in eukaryotes. *Genome research* **18**: 88-103

Schwelnus W, Richert K, Opitz F, Groß T, Habara Y, Tani T, Käufer NF (2001) Fission yeast Prp4p kinase regulates pre-mRNA splicing by phosphorylating a non-SR-splicing factor. *EMBO reports* **2**: 35-41

Séraphin B, Kretzner L, Rosbash M (1988) A U1 snRNA:pre-mRNA base pairing interaction is required early in yeast spliceosome assembly but does not uniquely define the 5' cleavage site. *The EMBO journal* **7**: 2533-2538

Shen M, Mattox W (2012) Activation and repression functions of an SR splicing regulator depend on exonic versus intronic-binding position. *Nucleic acids research* **40**: 428-437

Siliciano PG, Guthrie C (1988) 5' splice site selection in yeast: genetic alterations in base-pairing with U1 reveal additional requirements. *Genes & development* **2**: 1258-1267

Staknis D, Reed R (1994) SR proteins promote the first specific recognition of Pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Molecular and cellular biology* **14**: 7670-7682

Staley JP, Guthrie C (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* **92**: 315-326

Stevens SW, Ryan DE, Ge HY, Moore RE, Young MK, Lee TD, Abelson J (2002) Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Molecular cell* **9**: 31-44

Tang Z, Käufer NF, Lin RJ (2002) Interactions between two fission yeast serine/arginine-rich proteins and their modulation by phosphorylation. *The Biochemical journal* **368**: 527-534

Tang Z, Tsurumi A, Alaei S, Wilson C, Chiu C, Oya J, Ngo B (2007) Dsk1p kinase phosphorylates SR proteins and regulates their cellular localization in fission yeast. *The Biochemical journal* **405**: 21-30

Tardiff DF, Rosbash M (2006) Arrested yeast splicing complexes indicate stepwise snRNP recruitment during in vivo spliceosome assembly. *RNA* **12**: 968-979

Tarn WY, Steitz JA (1994) SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions in vitro. *Genes & development* **8**: 2704-2717

Varani G, McClain WH (2000) The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO reports* **1**: 18-23

Wahl MC, Will CL, Lührmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**: 701-718

Wang Z, Hoffmann HM, Grabowski PJ (1995) Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity. *RNA* **1**: 21-35

Webb CJ, Romfo CM, van Heeckeren WJ, Wise JA (2005) Exonic splicing enhancers in fission yeast: functional conservation demonstrates an early evolutionary origin. *Genes & development* **19**: 242-254

Webb CJ, Wise JA (2004) The splicing factor U2AF small subunit is functionally conserved between fission yeast and humans. *Molecular and cellular biology* **24**: 4229-4240

Will CL, Lührmann R (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**

Wilson-Grady JT, Villén J, Gygi SP (2008) Phosphoproteome analysis of fission yeast. *Journal of proteome research* **7**: 1088-1097

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhoft A, Fritz C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Dominguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871-880

Wood V, Harris MA, McDowall MD, Rutherford K, Vaughan BW, Staines DM, Aslett M, Lock A, Bähler J, Kersey PJ, Oliver SG (2012) PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic acids research* **40**: D695-699

- Wood V, Rutherford KM, Ivens A, Rajandream MA, Barrell B (2001) A re-annotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Comparative and functional genomics* **2**: 143-154
- Wu J, Manley JL (1989) Mammalian pre-mRNA branch site selection by U2 snRNP involves base pairing. *Genes & development* **3**: 1553-1561
- Wu JY, Maniatis T (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**: 1061-1070
- Wu S, Romfo CM, Nilsen TW, Green MR (1999) Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* **402**: 832-835
- Xia T, SantaLucia J, Jr., Burkard ME, Kierzek R, Schroeder SJ, Jiao X, Cox C, Turner DH (1998) Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson-Crick base pairs. *Biochemistry* **37**: 14719-14735
- Yu AT, Ge J, Yu YT (2011) Pseudouridines in spliceosomal snRNAs. *Protein & cell* **2**: 712-725
- Zeytuni N, Zarivach R (2012) Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure* **20**: 397-405
- Zhang C, Lopez MS, Dar AC, Ladow E, Finkbeiner S, Yun CH, Eck MJ, Shokat KM (2013) Structure-guided inhibitor design expands the scope of analog-sensitive kinase technology. *ACS chemical biology* **8**: 1931-1938
- Zhang C, Shokat KM (2007) Enhanced selectivity for inhibition of analog-sensitive protein kinases through scaffold optimization. *Tetrahedron* **63**: 5832-5838
- Zhou Z, Fu XD (2013) Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma* **122**: 191-207
- Zhuang Y, Weiner AM (1986) A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* **46**: 827-835
- Zuo P, Maniatis T (1996) The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing. *Genes & development* **10**: 1356-1368

VI Anhang

1 DNA- und Aminosäuresequenz der spPrp4 Kinase (GenBank acc. No. L10739.1)

Das Intron, sowie die drei Nukleotide, die die Gate-Keeper Aminosäure codieren sind in der DNA-Sequenz rot markiert. In der Aminosäuresequenz ist die Kinasedomäne grün markiert und das Phenylalanin (F), das den Gate-Keeper bildet rot hervorgehoben.

1	ATGAGTGACG	ATAGATTTGC	AGAAGATGAA	ATTATACAGC	AAAGACGGAA	ACGGAGGTTG
61	GAAATTTTAA	AGAAGTACCA	ACAGACTGGC	AATGGCCATT	CGGATTTGTC	AATTCCAGAG
121	AAAAAGCTAA	AAGAAGATGT	CGACCAAGTC	TCTACAACGA	AACCTATCGA	AGCTGTACCA
181	AAAATGAAAA	CCAATGCATC	TAAAATTGAG	ATTAACAAAG	AAGGTTCTAA	TTCTAATACT
241	AAGCTTGATG	TAAC TAATAG	TACTACTAGT	GATTCCCCCT	CTATCAAATC	TTCTGTACAA
301	ATTGAAGATA	CTGAAGATGA	CATGTTTGCA	GATTCTCCTT	CGCCTTCTGT	TAAGCGGCAA
361	AACACTGGGA	AAGGTATTTT	CAC TCTAACT	AGGAGTTTTG	CAGATATGCA	GGATAATTGG
421	GACGATATTG	AAGGTTATTA	TAAGGTAGTT	CTTATGGAGG	AATTGGATTG	TCGTTACATC
481	GTT CAGTCCA	ACCTTGGTAA	AGGCATGTTC	TCTACGGTGG	TCAGTGCTTT	GGATCGGAAT
541	AGAAATCAAA	CTTTCGCTAT	AAAAATAATT	AGAAACAATG	AGGTAATGTA	TAAGGAGGGA
601	CTCAAAGAAG	TATCAATTCT	TGAGCGACTG	CAAGCAGCGG	ATCGTGAAGG	TAAGCAGCAC
661	ATAATCCACT	ATGAAAGGCA	TTTCATGCAC	AAAAATCATC	TTTGCATGGT	GTTT GAGATG
721	TTAAGTCTTA	ATCTTCGGGA	CATTTTGAAA	AAATTTGGGC	GTAACGTTGG	GTTGAGTATA
781	AAGGCTGTTC	GTCTGTATGC	CTATCAAATG	TTCATGGCAT	TGGATTTGTT	GAAGCAATGC
841	AACGTAATTC	ATTCAGATAT	CAAACCGGAC	AATATGCTGG	TGAACGAAAA	AAGAAATATT
901	TTAAAAATAT	GTGACCTTGG	TTCTGCTTCA	GATGCCTCTG	AAAATGAAAT	AACACCGTAC
961	CTCGTGAGTC	GATTTTATCG	TGCTCCAGAA	ATCAGTAAGT	CTAAATAAAC	GCCAAATTGC
1021	TTATAATTCC	AAAAATATGG	AAATTGAATT	CTTCTTCTCA	TTACTTTTGT	ACTCTTTTTT
1081	CAAGATCTAA	CCTTTAAAAA	AGTTTTAGGC	TTTCCTTATT	CGTGTCCAAT	AGATACATGG
1141	AGTGTTGGAT	GTTCTTTATA	TGAGTTGTAT	ACTGGTCAAA	TACTATTTCC	TGGCCGAACA
1201	AATAACCAGA	TGCTTCGCTA	TATGATGGAA	TGTAAGGGGA	AGTTCAGTCA	TAAAATGTTA
1261	AAAAGAAGTC	AATTTTAAAA	TGACCATTTT	GACGCGGATT	TCAATTTTCA	ACAAATTGAT
1321	CATGACCCCA	TTACAAATCA	AGAAACGAGG	AAACCTGTAA	AATTCTCTAA	GCCGACCAAA
1381	GACATTCGAT	CTCGTTTAAA	AGAAGTCCCA	ACTTCAACTG	ATGAGGAATT	TATAATTGCA
1441	CAAGAGCTTA	TGGATCTTTT	GGAAAAATGT	TTGGAGCTTA	ATCCAGAGAA	ACGCGTACCG
1501	CCTGAAGTAG	CTTTGAAGCA	TCCTTTCTTT	ATAAAAAAAT	AA	
1	MSDDRFAEDE	IIQQRKRRL	EILKKYQQTG	NGHSDLSIPE	KKLKEDVDQV	STTKPIEAVP
61	KMKTNASKIE	INKEGSNSNT	KLDVTNSTTS	DSPSIKSSVQ	IEDTEDDMFA	DSPPSPVKRQ
121	NTGKGISTLT	RSFADMQDNW	DDIEGYKVV	LMEELDSRYI	VQSNLGKGMF	STVVSALDRN
181	RNQTFAIKII	RNNEVMYKEG	LKEVSILERL	QAADREGKQH	IIHYERHFMH	KNHLCMVFEM
241	LSLNLRDILK	KFGRNVGLSI	KAVRLYAYQM	FMALDLLKQC	NVIHSDIKPD	NMLVNEKRNI
301	LKICDLGSAS	DASENEITPY	LVSRYFRAPE	IILGFPYSCP	IDTWSVGCSL	YELYTGQILF

361 PGRTNNQMLR YMMECKGKFS HKMLKRSQFL NDHFDADFNF IQIDHDPITN QETRKPVKFS
 421 KPTKDIRSRL KEVPTSTDEE FIIRQELMDL LEKCLELNPE KRVPPPEVALK HPFFIKK

2 Trotz stündlicher Inhibitorzugabe beginnen die Zellen erneut zu wachsen

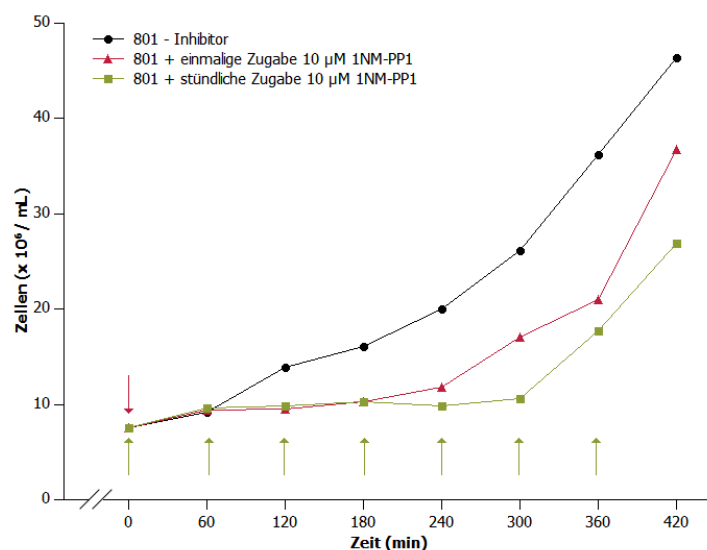


Abbildung 52| Stündliche Inhibitorzugabe verlängert den Wachstumsstopp nicht unbegrenzt

Eine wachsende Kultur des Stamms 801 wurde in 3 Kulturen geteilt. Eine Kultur wurde ohne Inhibitorzugabe (schwarz), eine mit einmaliger Zugabe von 10 µM 1NM-PP1 (rot) und eine mit stündlicher Inhibitorzugabe von je 10 µM 1NM-PP1 (grün) gezählt. roter Pfeil; einmalige Zugabe; grüne Pfeile, stündliche Inhibitorzugabe

3 Häufigkeitsverteilung der Basen an den einzelnen Positionen der Spleißstellen bei Prp4-unabhängigen und –abhängigen Introns

Der prozentuale Anteil der einzelnen Basen an jeder Position von Exon1/5'-SS, BS und 3'-SS bei Prp4-unabhängigen und –abhängigen Introns wurde berechnet und gegenübergestellt. Die Positionen, die mehr als 10 % Unterschied aufweisen, wurden rot markiert.

Tabelle 21| Prp4-unabhängige Introns

	Exon1			5'-SS						BS					3'-SS		
Position	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	1	2	3	4	5	1	2	3
Konsensussequenz	A	A	G	G	U	A	A	G	U	C	U	A	A	C	U	A	G
A (%)	48,4	50,0	13,9	-	-	94,9	52,4	3,7	14,2	0,4	-	90,9	100	1,1	10,0	100	-
C (%)	16,5	11,2	7,3	-	0,2	-	8,7	0,5	8,7	79,3	-	0,8	-	70,4	0,1	-	-
G (%)	14,5	15,0	63,5	100	0,2	2,3	2,5	92,8	5,7	0,1	-	5,9	-	0,1	17,7	-	100
U (%)	20,6	23,8	15,3	-	99,6	2,8	36,4	3,0	71,4	20,2	100	2,4	-	28,4	72,2	-	-

Tabelle 22| Prp4-abhängige Introns

	Exon1			5'-SS						BS					3'-SS		
Position	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	1	2	3	4	5	1	2	3
Konsensus-sequenz	A	A	G	G	U	A	A	G	U	C	U	A	A	C	U	A	G
A (%)	41,9	43,3	19,1	-	-	91,9	45,4	7,8	21,1	0,6	-	86,6	100	1,8	16,0	100	-
C (%)	16,9	16,4	11,9	-	0,1	0,2	11,3	1,8	12,7	75,2	-	1,0	-	67,0	19,8	-	-
G (%)	18,2	14,6	45,1	100	-	3,4	4,7	81,4	9,2	0,2	-	9,4	-	-	0,2	-	100
U (%)	23,0	25,7	23,9	-	99,9	4,5	38,7	9,0	57,0	24,0	100	3,0	-	31,2	64,0	-	-

Abkürzungsverzeichnis

Ψ	Pseudouridin
3'-SS	3'-Spleißstelle
5'-SS	5'-Spleißstelle
A	Adenin
as	analog-sensitiv
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BP	Verzweigungspunkt (<i>engl. branchpoint</i>)
bp	Basenpaare
BS	Verzweigungssequenz (<i>engl. branch sequence</i>)
C	Cytosin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindole
dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DYRK	<i>dual-specificity tyrosine-regulated kinase</i>
ESE	<i>exonic splicing enhancer</i>
FACS	<i>Fluoreszent-Activated Cell Sorting</i>
G	Guanin
GTP	Guanosin-tri-phosphat
hs	<i>Homo sapiens</i>
Inh.	Inhibitor
M	Größenstandard (Marker)
MBF	<i>MluI cell cycle box binding factor</i>
Min.	Minute
mm	<i>Mus musculus</i>
mRNA	messenger-RNA
nt	Nukleotid
NTC	<i>nine teen complex</i>
prp	<i>pre-mRNA processing</i>
Prp4	<i>pre-mRNA processing protein 4 kinase</i>

RBD	RNA-Bindedomäne
RT	Raumtemperatur
sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sek.	Sekunde
snRNA	kleine Kern RNA (<i>engl. small nuclear RNA</i>)
snRNP	kleines Kern Ribonukleoprotein (<i>engl. small nuclear Ribonucleoprotein</i>)
sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SR	Serin/Arginin-reich
TPR	<i>tetra-trico peptide repeats</i>
U	Uracil
U	Einheit für enzymatische Aktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute

Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Norbert F. Käufer bedanken, dafür dass er mir dieses spannende Projekt überlassen und mich in seiner Arbeitsgruppe willkommen geheißen hat. Vielen Dank für die große Unterstützung, die interessanten Diskussionen und die hilfreiche Kritik.

Bei Herrn Prof. Dr. André Fleißner möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats sowie für die Ideen und Anregungen zu dieser Arbeit bedanken.

Dr. Florian Bittner möchte ich herzlich für die Bereitschaft danken einer der Prüfer meiner Prüfungskommission zu sein.

Prof. Dr. José Ayté danke ich für die herzliche Aufnahme in Barcelona und für seine Unterstützung während dieser Arbeit.

Auch Dr. Martin Lützelberger danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und die große Geduld bei der Beantwortung aller Fragen.

Vielen lieben Dank Susi, für die Unterstützung jeglicher Art, für die wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche, für die wirklich schöne Zeit im Labor und natürlich auch für den einen oder anderen Abenteuerausflug. Vielen Dank Nicole für das geduldige Korrekturlesen meiner Arbeit, die vielen Diskussionen der letzten Monate und den Spaß dabei. Ein Dankeschön geht auch an Ulrike. Danke für die Tipps und Tricks im Laboralltag, die leckersten Geburtstagskuchen und die lustige Zeit bei uns.

Außerdem möchte ich mich bei allen ehemaligen Mitarbeitern und Studenten der Arbeitsgruppe Käufer bedanken. Franzi, Aleh, Michelle, Susann, Viviane, Mudit und Carolin, danke für die schöne Zeit mit Euch.

Ich danke auch herzlich allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik für die freundliche Aufnahme und die gute Atmosphäre im Institut.

Auch bei all meinen Freunden möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Mirjana, Anna und Fred- ich danke Euch für die schöne Zeit im Studium und auch danach. Cora, Flo und Lena - vielen Dank für die schönen Abende bei Euch mit Nölen und Lachen. Ein großes Danke auch an Kathi und Tony, Tina, Thomas, Volker und die Braunschweiger Mädels, dafür dass Ihr immer ein offenes Ohr habt.

Insbesondere bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken, dafür dass Ihr immer hinter mir steht, mich bei meinen Entscheidungen unterstützt und aufmunternde Worte findet, wenn es nötig ist. Danke, dass Ihr immer für mich da seid.